

**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 :	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/05785
C12N 15/12, 15/63, 15/67 C12N 15/85, C07K 13/00 A61K 37/02		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. März 1994 (17.03.94)

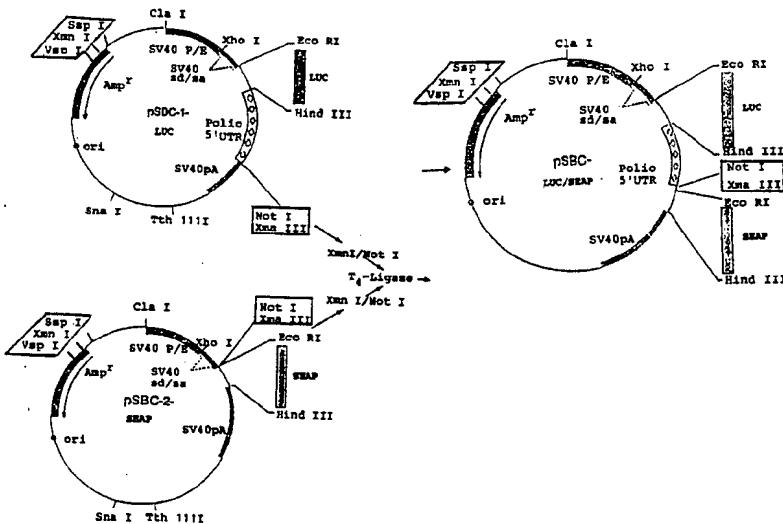
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/02294	(74) Anwälte: VOELKER, Ingeborg usw. ; Uexküll & Stolberg, Beselerstr. 4, D-22607 Hamburg (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 26. August 1993 (26.08.93)	(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, HU, JP, KZ, PL, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Prioritätsdaten: P 42 28 458.9 27. August 1992 (27.08.92) DE	(Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BEIERSDÖRF AG [DE/DE]; Unnastraße 48, D-20253 Hamburg (DE). GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE).	
(72) Erfinder; und	
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : DIRKS, Wilhelm [DE/DE]; Büttenweg 13, D-38106 Braunschweig (DE). WIRTH, Manfred [DE/DE]; Marktstraße 1, D-38300 Wolfenbüttel (DE). HAUSER, Hansjörg [DE/DE]; Georg-Westermannallee 29, D-38104 Braunschweig (DE). EICHNER, Wolfram [DE/DE]; Dorotheenstraße 49, D-22301 Hamburg (DE). ACHTERBERG, Volker [DE/DE]; Eimsbütteler Marktplatz 11, D-20257 Hamburg (DE). DÖRSCHNER, Albrecht [DE/DE]; Schanzenstraße 107, D-20357 Hamburg (DE). MEYER-INGOLD, Wolfgang [DE/DE]; Am Hasenkamp 29, D-22457 Hamburg (DE). MIELKE, Heiko [DE/DE]; Fischbeker Straße 22, D-21629 Neu Wulmstorf (DE).	

**(54) Title: MULTICISTRONIC EXPRESSION UNITS AND THEIR USE****(54) Bezeichnung: MULTICISTRONISCHE EXPRESSIONSEINHEITEN UND DEREN VERWENDUNG****(57) Abstract**

Multicistronic expression units allow the equimolar expression of the genes located in the corresponding cistrons. These expression units are particularly suitable for the recombinant production of proteins composed of two or more polypeptide subunits.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft multicistronische Expressionseinheiten, welche die äquimolare Expression der in den jeweiligen Cistrons positionierten Gene zulassen. Die Expressionseinheiten sind insbesondere geeignet zur rekombinanten Herstellung von Proteinen, welche aus zwei oder mehreren Polypeptid-Untereinheiten bestehen.



**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

**Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.**

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NE	Niger
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	HU	Ungarn	PL	Polen
BR	Brasilien	IE	Irland	PT	Portugal
BY	Belarus	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slowakischen Republik
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LV	Lettland	TC	Togo
CZ	Tschechischen Republik	MC	Monaco	UA	Ukraine
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	ML	Mali	UZ	Usbekistan
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

### Multicistronische Expressionseinheiten und deren Verwendung

Die Erfindung betrifft multicistronische Expressionseinheiten und deren Verwendung zur äquimolaren Expression von Polypeptiden oder Untereinheiten derselben in Säugerzellen als Wirtszellen.

Es ist bereits seit langem möglich, einzelne Proteine, deren Gene durch Klonierung isoliert wurden, nach Manipulation und Gentransfer in verschiedenen prokaryontischen und eukaryontischen Zellen herzustellen. Für das Erreichen der vollen biologischen Aktivität vieler Proteine sind korrekte Faltungen, richtiges Prozessieren und gegebenenfalls auch posttranskriptionale Modifikationen erforderlich, welche in prokaryontischen und niederen eukaryontischen Expressionssystemen oftmals nicht korrekt ausgeführt werden. Aus diesem Grund bedient man sich häufig Säugerzellen als Wirte. Säugerzellen sind darüber hinaus in der Lage, große Mengen von Proteinen zu sekretieren.

- 2 -

Aus den verschiedensten Gründen bedarf es oftmals der simultanen Herstellung zweier oder mehrerer Proteinketten. Zum Beispiel sind viele natürliche Proteine in ihrer funktionellen Form aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt (z.B. Antikörper). Natürlich erweist sich die Assoziation verschiedener Untereinheiten von komplexen Proteinen nach der Proteinsynthese. An dieser Assoziation sind häufig andere Komponenten des zellulären Apparates als Katalysatoren oder Kontrollelemente beteiligt, wobei es gelegentlich auch zu Umfaltungen der ursprünglichen Strukturen kommt. Störungen der Assoziation, z.B. durch ungleiche Synthese der einzelnen Komponenten, können sowohl für die zu bildenden Proteine als auch für die Wirtszelle negative Konsequenzen haben. Natürlich erweist sich dieses System einer ausfeilten, meist zellspezifischen Regulation. Da diese Regulation in genetisch manipulierten Zellen im allgemeinen nicht nachstellbar ist, wurden die nachfolgend erläuterten Alternativen zur simultanen Herstellung mehrerer Fremdproteine entwickelt und angewandt:

- 20 1) Die Gene werden getrennt in Expressionsvektoren integriert und dann in einem geeigneten Verhältnis in die Zellen cotransferiert. Dies setzt voraus, daß mehrere Plasmidkopien gleichzeitig stabil aufgenommen und bei der Teilung weitergetragen werden. Das Verhältnis der Expression der verschiedenen Gene zueinander hängt sowohl von der Kopienzahl als auch von der Integrationsstelle im Genom der Wirtszelle ab. Durch aufwendige Screeningverfahren ist es möglich, Zellklone zu isolieren, welche die einzelnen Genprodukte im gewünschten Verhältnis zueinander exprimieren.
- 30 2) Um die Kopienzahl zu nivellieren, werden die verschiedenen Gene in unabhängigen Transkriptionseinheiten auf einem Vektor plaziert. Dies sichert weitgehend die stöchiometrische Repräsentanz der Gene, aber auch dieses Verfahren ist mit Problemen behaftet. Selbst wenn nämlich Expressionseinheiten mit Promotoren gleicher Stärke verwendet werden, ist

keineswegs sichergestellt, daß die mRNAs, welche für die verschiedenen Proteine kodieren, die gleiche Stabilität und Translationseffizienz aufweisen. Auch die Transkriptions-  
5 effizienz beider Gene muß nicht zwangsläufig identisch sein. In diesem Fall wird mit Hilfe von gentechnischen Tricks (Positionierung der Transkriptionseinheiten zueinander, Modulation der Stärke der einzelnen Promotoren durch Wegnehmen oder Hinzufügen einzelner Elemente) die Stöchiometrie der Expression schrittweise hergestellt.

10

- 3) Zur Vermeidung der Probleme im Zusammenhang mit der Stabilität der mRNA verschiedener Transkripte wurden bi- oder multicistronische Vektoren entwickelt. Hierzu liegen die einzelnen Leseraster der die Proteinketten kodierenden  
15 Genabschnitte - Cistrons - auf einer Transkriptionseinheit (Expressionseinheit). Die Expression des multicistronischen Gens erfolgt durch einen einzigen Promotor. Bei derartigen Vektoren wird normalerweise das erste Cistron sehr effizient translatiert, die nachfolgenden aber in Abhängigkeit von den intercistronischen Sequenzen. Verwendet man für  
20 diese intercistronischen Sequenzen normale 5' nicht translatierte Sequenzen (5'UTR) aus monocistronischen Genen, so ist die Expression des nachfolgenden Cistrons meist sehr niedrig (in der Regel um 0,5 bis 2% der Translation des ersten Cistrons, Kaufman et al., 1987; Boel et al., 1987). Diese Effizienz konnte zunächst durch Einfügen von Leader-  
25 sequenzen (High Efficiency Leadern, HEL) auf etwa 20% gesteigert werden. Mit der Entdeckung und Verwendung von bestimmten zellulären und viralen Sequenzen, welche eine interne Translationsinitiation ermöglichen (IRES; Jackson et al., 1990) war es möglich, ein Translationsverhältnis zwischen dem ersten und dem nachfolgenden Cistron von 3:1 zu erzielen.

35 Die Schlüsselrolle bei der Verwendung bi- oder multicistronischer Vektoren spielt die Translation. Normalerweise erfolgt die

Initiation der Translation in Eukaryonten nach dem "cap"-abhängigen Mechanismus, im Verlaufe dessen ein Prä-Initiationskomplex aus Proteinen und RNA am 5' Ende einer mRNA mit "cap" (methyliertes Nukleotid) aufgebaut wird. Von dort aus wird ein geeignetes Translationsinitiationskodon ausgesucht, von dem ausgehend die Translation gestartet wird. Man glaubt, daß dies über einen "Scanning"-Prozeß abläuft, wobei sich der Prä-Initiationskomplex entlang der mRNA in 3'Richtung bewegt. Auf diese Weise wird, von einigen Ausnahmen abgesehen, immer das am 5' Ende liegende Cistron effizient translatiert (Kozak, 1989). Alle nachfolgenden Cistrons werden gar nicht oder sehr ineffizient translatiert. Die Translations-Effizienz der nachfolgenden Cistrons konnte durch Optimierung des Abstandes zwischen den Genen (intercistronische Regionen; Kozak, 1987; Wirth et al., 1991) oder durch Verwendung von sogenannten "high efficiency leader"-Sequenzen (HEL, s.o.) verbessert werden (z.B. Falcone und Andrews, 1991 und Ref. darin). HEL's sind solche 5'nicht translatierten Bereiche von Genen oder auch anderen Sequenzen, welche die Initiation der "cap"-abhängigen Translation stimulieren. Auch bei derartigen Konstrukten sind jedoch die erreichbaren Expressionswerte für das zweite und die nachfolgenden Cistrons immer deutlich geringer als die des "cap"-abhängig regulierten ersten Cistrons.

Ein in den letzten Jahren aufgedeckter Mechanismus zur internen Translationsinitiation, d.h. der Start der Translation an einer mRNA ohne "cap"-Struktur, benutzt spezifische Nukleinsäuresequenzen. Zu diesen Sequenzen zählen die nicht translatierten Bereiche einzelner Picorna-Viren, z.B. Polio-Virus, Encephalomyocarditis-Virus, (Pelletier und Sonenberg, 1988; Jang et al., 1988; Jang et al., 1989) sowie einiger zellulärer Proteine, z.B. BiP (Macejak und Sarnow, 1991). Bei den Picorna-Viren sorgt ein kurzer Abschnitt des 5'nicht translatierten Bereichs, das sogenannte IRES (internal ribosomal entry site), für die interne Bindung eines Prä-Initiationskomplexes. Ein Bereich von 628 nt ist im Fall des Poliovirus Typ 1 für die effiziente Initiation

dieser Translation notwendig. Untersuchungen zeigten, daß für eine effiziente Translation nicht nur die 400 Basenpaare des 3'-Bereiches von IRES, sondern auch der extreme 5' Teil des Poliovirus nicht-translatierten Region notwendig ist (Simoes und Sarnow, 1991). Auf der anderen Seite führt das "capping", die Voraussetzung für den normalen Initiationsmechanismus der Translation, zu einer Reduktion der Effizienz der internen Initiation von Polio-Virus IRES, wenn er am 5' Ende einer entsprechenden mRNA lokalisiert ist (Hambidge und Sarnow, 1991). Der negative Effekt wird aufgehoben, wenn die IRES für die Initiation des zweiten Cistrons verantwortlich ist, also zwischen "cap" und IRES ein Cistron liegt.

IRES-Elemente können also als Initiatoren für die effiziente Translation von Leserastern fungieren. Dabei beeinflussen sie die "cap"-abhängige Translation des ersten Cistrons nicht. Auch umgekehrt scheint eine Beeinflussung der IRES-abhängigen Initiation unabhängig von der "cap"-abhängigen Translationsinitiation zu sein. Die Mechanismen beider Vorgänge unterscheiden sich auch deutlich in der Verwendung verschiedener zellulärer Faktoren (Meerovitch et al., 1989; Jang und Wimmer, 1990). In der vergangenen Zeit wurden mehrere Untersuchungen publiziert, bei denen bicistronische Expressionsplasmide verwendet wurden (Adam et al., 1991; Ghattas et al., 1991; Kaufman et al., 1991; Wood et al., 1991; Wirth et al., 1991). Da aber offensichtlich die "cap"-abhängige Translation stärker ist als die IRES-abhängige Translation, konnte eine stöchiometrische Expression zweier Proteinketten nicht erreicht werden. Die bisherigen Verwendungen konzentrierten sich deshalb auf die Verwendung von Selektionsmarkern im zweiten Cistron. Die enge Expressionskoppelung des Selektionsmarkers mit dem zu exprimierenden Gen, welches das erste Cistron darstellt, ist besonders vorteilhaft bei der Selektion auf Hochexpression, insbesondere, wenn eine vorausgehende Genamplifikation erforderlich ist. Die Synthese äquimolarer Proteinmengen von bi- oder multicistronischen Expressionsvektoren ist jedoch bisher nicht erreicht worden.

Ein typisches Beispiel für die Bedeutung, welche der äquimolaren Expression zweier verschiedener Proteinketten in rekombinannten Herstellungsverfahren zukommen kann, ist die gentechnologische Gewinnung des Wachstumsfaktors aus Blutplättchen, "Platelet-Derived-Growth-Factor" (PDGF), einem der Hauptmitogene im menschlichen Blutserum. Aus menschlichen Thrombozyten aufgereinigtes PDGF besteht aus zwei unterschiedlichen, aber nahe verwandten Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Unter reduzierenden Bedingungen zerfällt das dimere PDGF in seine monomeren Untereinheiten, wovon die größere ( $M_r$  15-17.000 D) als PDGF-A-Kette und die kleinere ( $M_r$  14.000 D) als PDGF-B-Kette bezeichnet wird (Johnsson et al., 1984).

Die Proteinketten PDGF-A und -B werden von verschiedenen Genen kodiert. Die vollständige Struktur beider Genprodukte konnte durch cDNA-Klonierung aufgeklärt werden (Ratner et al., 1985, Betsholtz et al., 1986). Dabei zeigte es sich, daß beide PDGF-Moleküle zunächst als ungewöhnlich lange Vorläufermoleküle, sog. Precursoren, synthetisiert und anschließend intrazellulär zu den reifen PDGF-Ketten prozessiert werden. Durch alternatives Splicing lassen sich zwei verschiedene PDGF-A-Transkripte erklären, die sich durch An- oder Abwesenheit eines 69-bp Segmentes im 3'-Bereich unterscheiden (Betsholtz et al., 1986; Wise et al., 1989). Durch dieses Insert kommt es zu einer Änderung im codierenden Abschnitt mit der Folge, daß eine kurze (PDGF-A<sub>K</sub>, 110 Aminosäuren) und eine lange (PDGF-A<sub>L</sub>, 125 Aminosäuren) Form der PDGF-A-Kette gebildet wird. Beide Varianten sind als normale zelluläre Proteine nebeneinander nachweisbar, wobei die kürzere Form die häufigere Spezies ist (Matoskova et al., 1989; Young et al., 1990).

Beide Gene sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert und zeigen einen hohen Homologiegrad. Eine Vielzahl von Arbeiten zeigt, daß beide Gene unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen. Eine Folge davon ist, daß beide PDGF-Ketten natür-

licherweise in verschiedenen Zelltypen in unterschiedlichem Verhältnis zueinander produziert werden.

Alle drei möglichen Isoformen des PDGF (AA, AB und BB) kommen 5 natürlicherweise vor und sind in Thrombozyten in sogenannten  $\alpha$ -Granula gespeichert. Aus überlagerten menschlichen Blutplättchen kann neben dem die Hauptmenge bildenden PDGF-AB Heterodimer auch PDGF-BB zu etwa 30 % isoliert werden (Hammacher et al., 1988). Frisch präparierte Blutplättchen enthalten auch einen 10 hohen Anteil (27%) an PDGF-AA (Hart et al., 1990). Es kann daher angenommen werden, daß in den Vorläuferzellen der Thrombozyten, den Megakaryozyten, der Anteil beider Homodimere zusammen etwa dem AB-Heterodimer-Anteil entspricht. Da die Konzentration jeder 15 PDGF-Spezies im Thrombozyten direkt korrelieren sollte mit ihrer individuellen Bedeutung im Wundheilungsgeschehen, kommt insbesondere der häufigsten Isoform, dem PDGF-AB, eine herausragende Bedeutung auf der Suche nach einem "Wundheilungshormon" zu.

Jede der verschiedenen Isoformen besitzt biologische Aktivität 20 *in vitro*. Erst die Verfügbarkeit der hochreinen, rekombinannten PDGF-Isoformen (Hoppe et al., 1989; Hoppe et al., 1990) machte vergleichende Studien zur Differenzierung der unterschiedlichen Wirkungsspektren der verschiedenen PDGF-Spezies möglich. Inzwischen belegen eine Reihe von Untersuchungen die unterschiedliche 25 Potenz von PDGF-AA, AB und BB im Chemotaxis- und DNA-Proliferationstest (Hosang et al., 1989; Nister et al., 1988; Reilly & Broski, 1989; Siegbahn et al., 1990), sowie deren unterschiedlichen Einfluß auf die Freisetzung von Inositol-1,4,5-trisphosphat, Produktion von Diacylglycerol und  $[Ca^{2+}]_i$ -Mobilisierung 30 (Block et al., 1989; Sachinidis et al., 1990 A, 1990 B). Zwei unterschiedliche PDGF-Rezeptorpopulationen, von denen der PDGF- $\alpha$ -Rezeptor alle PDGF-Isoformen und der  $\beta$ -Rezeptor nur PDGF-BB bindet (Hart et al., 1988; Heldin et al., 1988) liefern eine plausible Erklärung dafür, wie sich Wirkungsunterschiede der 35 PDGF-Isoformen über deren unterschiedliche Potenz zur Rezeptorkaktivierung entfalten können. Die meßbaren unterschiedlichen *in*

vitro-Effekte der PDGF-Isoformen, zusammen mit dem Nachweis zweier verschiedenener Rezeptorpopulationen, lassen Rückschlüsse auf unterschiedliche *in vivo* Wirkungsspektren von PDGF-AA, AB und BB zu. Daher ist die Produktion von reinem PDGF-AB, ohne 5 PDGF-BB oder PDGF-AA als Begleitproteine, wünschenswert. Um ein homogenes, gut charakterisiertes Heterodimer zu erhalten, müßten die Homodimere sonst durch Reinigung vollständig eliminiert werden, was durch die sehr ähnlichen chromatographischen Eigenschaften aller PDGF Spezies zusätzlich erschwert wird.

10

Eine Reihe verschiedener Wege zur Herstellung von rekombinanten PDGF-Homodimeren, insbesondere PDGF-BB, sind zum Teil schon seit längerer Zeit bekannt (Kelly et al., 1985; Heldin et al., 1986; Hoppe et al., 1989; Beckmann et al., 1988; Bywater et al., 1988; 15 Stroobant & Waterfield 1984). Ein Herstellungsverfahren für hochreines PDGF-AB wurde von Hoppe et al. (1990, s.a. PCT/EP 90/00 063) beschrieben. Hier werden die getrennt in unterschiedlichen *E. coli*-Zellen hergestellten, inaktiven Monomere durch *in vitro*-Renaturierung in biologisch aktives PDGF-AB überführt.

20

Die bislang synthetisierten Genprodukte der drei PDGF-Isoformen weisen, trotz varierender Länge der A- bzw. B-Einzelstränge, weitgehend übereinstimmende biologische Aktivität auf.

25 Für die heterologe Expression von PDGF-AB Heterodimeren in eukaryontischen Systemen gelten die eingangs erwähnten Kriterien der simultanen Expression zweier (oder mehrerer) Proteine. Die bisher publizierten Strategien zur Herstellung von PDGF-AB in rekombinanten CHO-Zellen (Östman et al., 1988) und mit Hilfe von 30 Hefe-Expressionssystemen [EP 0 259 632] entsprechen dem oben unter 2) erläuterten Fallbeispiel, wo sich beide PDGF-Gene in unabhängigen Transkriptionseinheiten auf einem Vektor befinden. Die Quantifizierung der auf diese Weise in CHO-Zellen exprimierten unterschiedlichen PDGF-Dimere ergab 19% für PDGF-AA, 69% für 35 PDGF-AB und 12% für PDGF-BB (Östman et al., 1988).

- 9 -

Eine Grundvoraussetzung für die bevorzugte Synthese von PDGF-AB Heterodimeren mit Hilfe eukaryontischer Expressionssysteme ist nicht nur in der stöchiometrischen Repräsentanz beider Gene, sondern in erster Linie auch in deren koordinierter Expression 5 zu sehen. Daher bieten sich bicistronische Expressionseinheiten als mögliche Hilfsmittel für die Expression heterodimerer Proteine und damit des PDGF-AB an. In WO 90/01550 wird ein derartiges System auch für die Expression von PDGF beschrieben. Wie unter Punkt 3) oben näher erläutert, liefern diese Konstrukte 10 jedoch nur sehr limitierte Expressionsraten für das zweite (und nachfolgende) Cistron(s). Abhängig von der im ersten Cistron lokalisierten PDGF-Kette werden vorwiegend Homodimere dieses Typs gebildet. Bisher in der Literatur beschriebene Versuche, beide PDGF-Gene mit Hilfe anderer Expressionssysteme in einer 15 eukaryontischen Zelle zu exprimieren, führten zu Homodimer-Nebenproduktanteilen im Bereich von 30% oder mehr. Um dennoch mit diesen Zellsystemen hochreines PDGF-AB zu erhalten, müssen aufwendige und extrem verlustreiche Reinigungstechniken angewendet werden.

20

Es ist demgemäß Aufgabe der Erfindung, Mittel zu schaffen, mit deren Hilfe die rekombinante Herstellung von 2 oder mehreren Polypeptiden oder deren Untereinheiten in jeweils äquimolaren Mengen möglich ist und die weiterhin die bevorzugte Bildung von 25 Hetero(di)meren gewährleisten. Ausbeute und Wirtschaftlichkeit der nachgeschalteten Proteinreinigungsverfahren wird dadurch beträchtlich verbessert.

Zur Lösung der Aufgabe wird erfindungsgemäß eine multicistronische Expressionseinheit zur äquimolaren Expression von Polypeptiden oder Untereinheiten derselben in Säugerzellen als Wirtszellen vorgeschlagen, welche gekennzeichnet ist durch die allgemeine Formel

35

p - 5'UTR - C<sub>1</sub> - (IRES - Y - C<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - 3'UTR - polyA,

in der

"p" ein transkriptionaler Promotor ist,

5 "5'UTR" eine nicht translatierte Nukleotidsequenz ist,

n 1, 2 oder 3 ist,

10 "C<sub>1</sub>" und "C<sub>2</sub>" Cistrons sind, welche jeweils ein für ein Polypeptid oder dessen Untereinheit kodierendes Gen enthalten, wobei dann, wenn n 2 oder 3 ist, die Sequenzen C<sub>2</sub> der aufeinanderfolgenden Gruppen (IRES-Y-C<sub>2</sub>) untereinander gleich oder verschieden sein können und ferner C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> gleich oder verschieden sein können,

15 "IRES" eine Nukleotidsequenz viralen, zellulären oder synthetischen Ursprungs ist, die in der Stufe der Translation für die interne Initiation verantwortlich ist,

20 "Y" eine Nukleotidsequenz ist, welche im Zusammenwirken mit IRES für eine Expression des (der) in C<sub>2</sub> enthaltenen Gens(e) auf solche Weise sorgt, daß die Genprodukte von C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> in äquimolaren Mengen exprimiert werden,

25 "3'UTR" eine nicht translatierte Nukleotidsequenz ist und

30 "polyA" ein Polyadenylierungssignal ist.

In den patentgemäßen Konstrukten wurde durch Einführung interciströnischer Elemente eine Äquivalenz der Translationseffizienz 35 erreicht und überraschenderweise eine 1:1 Stöchiometrie der Genprodukte gefunden. Damit ist die wesentliche Grundlage für

die Expression von Hetero(di)meren in Animalzellen geschaffen. Dadurch, daß die Expressionskapazität der Zelle auf der Ebene der Transkription und Translation voll ausgeschöpft ist und zudem als Folge einer nahezu vollständig erfolgten Heterodimerisierung aufwendige Reinigungsschritte zur Entfernung von Homo(di)meren weitestgehend entfallen können, wird eine hohe Wirtschaftlichkeit der Produktion des jeweiligen Proteins in Säugerzellen gewährleistet.

10 In den erfindungsgemäßen Expressionseinheiten kommen als Promotoren alle diejenigen Promotoren in Betracht, die in eukaryontischen Zellen wirksam sind, d. h., die die Genexpression in eukaryontischen Zellen initiieren können. Insbesondere können alle konstitutiven und induzierbaren Promotoren viralen (beispielsweise die retroviralen "Long terminal repeats (LTR's) oder der frühe Promotor des Cytomegalie-Virus (CMV), zellulären (beispielsweise die humanen Actin- oder Ubiquitin-Promotoren) oder synthetischen Ursprungs verwendet werden. Erfindungsgemäß ist der SV40-Promotor bevorzugt.

20

Die 5'UTR und die 3'UTR sind beliebige, in der Regel nichttranslatierte Nukleotidsequenzen, die regulierende Elemente enthalten können und die der operativen Verknüpfung von "C<sub>1</sub>" bzw. "C<sub>2</sub>" mit den Transkriptionskontrollelementen dienen. Erfindungsgemäß geeignet ist beispielsweise die SV-40-Sequenz aus pBEH nach Artelt et al. (1988).

Als IRES können alle diejenigen Sequenzen viralen, zellulären oder synthetischen Ursprungs verwendet werden, welche eine interne Bindung der Ribosomen vermitteln. Beispiele für derartige Sequenzen sind die IRES aus *Poliovirus* Typ 1, 2 oder 3 sowie ferner die 5'UTR des *Encephalomyocarditis Virus* (EMCV), des "*Theilers murine encephalomyelitis virus*" (TMEV), des "*foot and mouth disease virus*" (FMDV), des "*bovine enterovirus*" (BEV), des 35 "*coxsackie B virus*" (CBV), des "*human rhinovirus*" (HRV) und die "*human immunoglobulin heavy chain binding protein*" (BIP) 5'UTR,

die *Drosophila Antennapediae* 5'UTR, die *Drosophila Ultrabithorax* 5'UTR oder genetische Hybride oder Fragmente aus den oben angeführten Sequenzen. Erfindungsgemäß bevorzugt ist die IRES aus Poliovirus Typ 1 gemäß SEQ ID Nr. 5 welche die ersten 628 Nucleotide der 5' nicht-translatierten Region des Poliovirus Typ 1 einschließt.

Als "Y" können alle diejenigen Nukleotidsequenzen eingesetzt werden, die im Zusammenwirken mit IRES wie in der allgemeinen Formel angegeben für eine Expression des (der) in C<sub>2</sub> enthaltenen Gens(e) auf solche Weise sorgt, daß die Genprodukte von C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> in äquimolaren Mengen exprimiert werden. Insbesondere kommen die *Xenopus laevis* β-Globin 5' UTR (Falcone and Andrews, 1991; Patient et al., 1983), die *Alfalfa mosaic virus* RNA4 5' UTR (Jobling and Gehrke, 1987), die Ferritin 5' UTR (animal, Klausner and Harford, 1989), die *Tobacco mosaic virus* 5' UTR ("Omega") plus Leadermutanten (Gallie et al., 1987A, 1987B; Gallie et al., 1988), die *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) 5' UTR, die *Brome mosaic virus* (BMV) RNA3 5' UTR und die *Rous sarcoma virus* (RSV) 5' UTR (vgl. jeweils Gallie et al., 1987B), die Adenovirus tripartite leader (L1-3) und Varianten (Berkner, ZymoGenetics) WO 90/01550; Berkner and Sharp (1985); Kaufman (1985), die *Xenopus borealis* 5' UTR β-Globin und die *Xenopus tropicalis* 5' UTR β-Globin (vgl. jeweils Knoechel et al., 1986) in Betracht, wobei die β-Globinsequenz aus *Xenopus laevis* gemäß SEQ ID NO: 4 erfundungsgemäß besonders bevorzugt ist.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist IRES die Poliovirus Typ 1 UTR gemäß SEQ ID NO: 3 und "Y" die β-Globinsequenz aus *Xenopus laevis* gemäß SEQ ID NO: 4.

Weitere geeignete IRES und "Y" Sequenzen können zudem mit dem unten näher beschriebenen Verfahren, welches ebenfalls Teil der Erfindung ist, ermittelt werden.

Die Cistrons  $C_1$  und  $C_2$  können unabhängig voneinander und in beliebiger Reihenfolge jeweils ein Gen enthalten, welches für eine Polypeptid-Komponente eines aus 2 oder mehreren derartiger Komponenten bestehenden singulären oder heteromeren Proteins kodiert, wobei die Gene erfindungsgemäß äquimolar exprimiert werden und die Komponenten demgemäß innerhalb einer Wirtszelle jeweils im Verhältnis 1:1 zur Verfügung stehen. Es können also die Cistrons  $C_1$  und  $C_2$  untereinander gleich oder verschieden sein, und die Cistrons  $C_2$  der aufeinanderfolgenden Gruppen (IRES-Y- $C_2$ ) können untereinander gleich oder verschieden sein. Insbesondere können  $C_1$  und  $C_2$  jeweils Gene enthalten, welche für die verschiedenen Untereinheiten von Faktor VIII, Kreatin-Kinase, Hämoglobin, Immunglobulinen, Histokompatibilitäts-Antigenen, T-Zell Rezeptoren, Scatter-Faktor (HGF-SF), Mitglieder aus der Familie des Transforming Growth Factor Typ  $\beta$ , Bone Morphogenic Protein (BMP), Mitglieder der Integrin-Familie, Mitglieder der Inhibin-Familie, PDGF oder deren natürliche oder synthetische Varianten und Derivate kodieren.

20 Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung PDGF-AB; demgemäß ist in der besonders bevorzugten Expressionseinheit "n" gleich 1, und  $C_1$  und  $C_2$  enthalten alternativ ein für die A- oder die B-Kette von PDGF, ein biologisch aktives Analogon oder ein Fragment derselben kodierendes Gen, 25 wobei beide Gene gleichzeitig in der Expressionseinheit vertreten sind.

Prinzipiell mußten jedoch für die Produktion von PDGF-AB zusätzlich Veränderungen am PDGF-B-precursor vorgenommen werden, da 30 sich PDGF-A- und B-Vorläufermoleküle in ihren biophysikalischen Eigenschaften unterscheiden. Es ist bekannt, daß die Expression von PDGF-B nicht zwangsläufig mit der Sekretion biologisch aktiven Materials korreliert. Ein Großteil des exprimierten PDGF-BB bleibt in enger Assoziation mit der Cytoplasmamembran (Robbins 35 et al., 1985). In CHO-Zellen ist die Expression von PDGF-B mit Hilfe monocistronischer Expressionsvektoren deutlich geringer

- 14 -

als die von PDGF-A. Die Ursache hierfür liegt darin, daß PDGF-BB extrazellulär über eine elektrostatische Wechselwirkung an der Plasmamembran der Produzentenzelle zurückgehalten und nur zu einem geringen Teil in das Medium abgegeben wird (La Rochelle et al., 1990; La Rochelle et al., 1991; Östman et al., 1991). Für die Vermittlung der Retention ist ein kurzer Abschnitt des C-terminalen Bereich des PDGF-B-precursors verantwortlich (Östman et al., 1991). In den patentgemäßen Konstrukten wurde dieser Abschnitt der PDGF-B-Vorläufersequenz durch die Einführung eines Stop-codons an das 3'-Ende der reifen PDGF-B-Kette entfernt. Die entsprechend verkürzte DNA-Sequenz für den PDGF-B-precursor wird als B190 gekennzeichnet. Sekretiertes PDGF-BB aus Kulturüberständen von Zellen, die mit diesem Konstrukt transformiert wurden, wird als B\* bezeichnet.

15

Zur Herstellung von PDGF-AB nach der Erfindung können C<sub>1</sub> oder C<sub>2</sub>, die PDGF-A<sub>K</sub>- (SEQ ID Nr. 1) oder die PDGF-A<sub>L</sub> Vorläufer-Sequenz, die vollständige PDGF-B Vorläufersequenz (SEQ ID Nr. 3), das v-sis-Gen aus Simian Sarcoma Virus oder die Basenpaare 283 bis 609 gemäß SEQ ID Nr. 3 oder ein Genfragment enthalten, das für ein PDGF-B-Vorläufermolekül kodiert, welches durch Ersetzen des für Arginin kodierenden Codons in der Aminosäureposition 191 des PDGF-B-precursors durch ein Translations-Stop-Codon verkürzt ist. Die vorgenannten Gene können in beliebiger Kombination vorliegen, soweit jeweils ein für die A- und die B-Kette kodierendes Gen vorhanden ist.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist eine Expressionseinheit, in der C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> alternativ die PDGF-A<sub>K</sub>-Sequenz (SEQ ID Nr. 1) oder die verkürzte PDGF-B Vorläufersequenz (SEQ ID Nr. 24) enthalten und beide Gene gleichzeitig in der Expressionseinheit vertreten sind.

Zur Ermittlung weiterer geeigneter IRES und "Y" Sequenzen wie unten im Einzelnen beschrieben dienen Expressionseinheiten, in denen "n" 1 ist und C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> voneinander verschiedene Reporter-

gene enthalten. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält eine derartige Expressionseinheit als Reportergene die für Luciferase (SEQ ID Nr. 22) und für sekretorische alkalische Phosphatase (SEQ ID Nr. 20) kodierenden Gene.

5

Gegenstand der Erfindung sind ferner rekombinante DNA Vektoren, welche die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten operativ insertiert enthalten. Erfindungsgemäß bevorzugte Vektoren und deren Herstellung sind in den Figuren 1 bis 6C dargestellt.

10

Die Erfindung schließt ferner Wirtszellen ein, welche Säugerzellen sind und die mit einem Vektor transformiert sind, der die erfindungsgemäße Expressionseinheit operativ insertiert trägt. Vorzugsweise handelt es sich um CHO- oder BHK-Zellen.

15

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft Wirtszellen, insbesondere BHK-Zellen, die mit Vektoren transformiert sind, die eine der für PDGF-AB kodierenden Expressionseinheiten tragen, wie sie oben im einzelnen beschrieben sind. Vorzugsweise handelt es sich um Vektoren, in denen C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub>, alternativ die PDGF-A<sub>X</sub>-Sequenz (SEQ ID Nr. 1) oder die vollständige (SEQ ID Nr. 3) bzw. die verkürzte (SEQ ID Nr. 24) PDGF-B Vorläufersequenz enthalten.

25 Erfindungsgemäß transformierte PDGF-AB produzierende BHK-Zellen wurden unter der Bezeichnung 92-22-6 (pSBC-PDGF-A/-G-B190, s. Tab. 2) entsprechend DSM ACC 2048 oder 92-22-7 (pSBC-PDGF-B190/G-A, s. Tab. 2) entsprechend DSM ACC 2049 am 11. 8. 1992 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 30 (DSM) hinterlegt.

Zur Ermittlung weiterer geeigneter IRES oder "Y" Sequenzen werden Wirtszellen kultiviert, die mit Vektoren transformiert sind, die Reportergene enthaltende Expressionseinheiten tragen, wie 35 sie oben im einzelnen beschrieben sind. Vorzugsweise handelt es sich um erfindungsgemäße Vektoren, welche die für Luciferase und

für sekretorische alkalische Phosphatase kodierenden Gene enthalten.

Erfindungsgemäß mit den Genen für Luciferase (SEQ ID Nr. 22) und 5 sekretorische alkalische Phosphatase (SEQ ID Nr. 20) transformierte Wirtszellen wurden unter der Bezeichnung 91-46-9 (pSBC-SEAP/-G-LUC, s. Tab. 1) entsprechend DSM ACC 2046 und 91-46-10 (pSBC-G-SEAP/LUC, s. Tab. 1) entsprechend DSM ACC 2047 am 11. 8. 1992 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) hinterlegt.

Die Erfundung schließt ferner Verfahren zur Herstellung von solchen Proteinen ein, die aus äquimolaren Anteilen unterschiedlicher Polypeptiduntereinheiten bestehen, indem man Wirtszellen, 15 die mit den oben im einzelnen beschriebenen erfundungsgemäßen Expressionseinheiten transformiert sind, in einem geeigneten Medium kultiviert und das so erzeugte Protein von den Zellen und dem Medium abtrennt.

20 Beispielsweise können auf diese Weise Proteine wie Faktor VIII, Kreatin-Kinase, Hämoglobin, Immunglobuline, Histokompatibilitäts-Antigene, T-Zell Rezeptoren, Scatter-Faktor (HGF-SF), Mitglieder aus der Familie des Transforming Growth Factor Typ  $\beta$ , Bone Morphogenic Protein (BMP), Mitglieder der Integrin-Familie, 25 Mitglieder der Inhibin-Familie, PDGF oder natürliche oder synthetische Varianten oder Derivate derselben hergestellt werden.

Mit den erfundungsgemäßen Vektoren ist es auch erstmals möglich, 30 Dimere des PDGF oder anderer Proteine, von denen verschiedene Spliceformen existieren, wie beispielsweise VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) zu erzeugen, die bisher nicht ohne weiteres herstellbar waren, wie dimeres PDGF-A des Typs lange/kurze Kette, PDGF-A<sub>L</sub>/PDGF-A<sub>K</sub> oder Moleküle des Typs PDGF-B/v-sis. Eine andere Möglichkeit stellen Di- oder Multimere dar, in denen nur 35 eine Kette Signalsequenzen für eine posttranskriptionale Modifikation, beispielsweise ein Glykosylierungssignal, enthält. Damit

sind also "einseitig" glykosylierte oder anderweitig modifizierte Proteine herstellbar.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung 5 dient das Verfahren zur Herstellung von heterodimerem rPDGF-AB indem man Wirtszellen, die mit Vektoren transformiert sind, welche erfindungsgemäß Expressionseinheiten tragen, die für die PDGF-A- und B-Ketten kodierende Gene tragen, in einem geeigneten Medium kultiviert, wie oben im einzelnen beschrieben. Das so er- 10 zeugte rPDGF-AB wird anschließend von den Zellen und dem Medium abgetrennt.

In Beispiel 2 konnte gezeigt werden, daß es mit Hilfe der erfin- 15 dungsgemäß bicistronischen Vektorsysteme möglich ist, aus- schließlich oder nahezu ausschließlich PDGF-AB Heterodimere zu erzeugen und der Synthese von PDGF-Homodimeren entgegenzuwirken. Unerwarteterweise wird in diesem Konstrukt die Expressionshöhe des zweiten Cistrons derart stimuliert, daß diese der Expressionshöhe des ersten Cistrons entspricht.

20

Vorzugsweise werden in diesem Zusammenhang erfindungsgemäß BHK Zellen kultiviert, die mit Vektoren transformiert sind, in denen C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> alternativ jeweils die PDGF-A<sub>k</sub>-Sequenz (SEQ ID Nr. 1) oder die vollständige (SEQ ID Nr. 3) bzw. die verkürzte (SEQ ID 25 Nr. 24) PDGF-B Vorläufersequenz enthalten.

Als Medium kommen alle bekannten Medien zum Kultivieren von Säu- 30 gerzellen in Betracht, einschließlich synthetischer, protein- freier oder proteinarmer Produktionsmedien. Erfindungsgemäß wur- de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), angereichert mit 4,5 g/l Glukose und 5 bis 10 % FCS, bevorzugt.

Das rPDGF-AB kann nach herkömmlichen Verfahren (vgl. beispiels- 35 weise Östmann et al. 1988), von den Zellen und dem Medium abge- trennt werden. Vorzugsweise bietet sich ein für PDGF-AA aus BHK-

Zellen entwickeltes und hoch effizientes Verfahren (Eichner et al., 1989) an.

Gegenstand der Erfindung ist schließlich heterodimeres rPDGF-AB, welches im wesentlichen frei ist von homodimeren Begleitprodukten und welches erhältlich ist durch Kultivieren der oben beschriebenen, erfindungsgemäßen Wirtszellen. Überraschenderweise hat es sich gezeigt, daß die mit dem erfindungsgemäßen Konstrukt transformierten Wirtszellen das heterodimere PDGF-AB mit einer Reinheit von 90% und mehr, bezogen auf die Gesamtmenge des gebildeten PDGF, sezernieren. Erfindungsgemäß bevorzugt ist heterodimeres PDGF-AB, welches zugänglich ist durch Kultivieren von BHK-Zellen, transformiert mit dem erfindungsgemäßen Konstrukt.

15

Das erfindungsgemäße rPDGF-AB unterscheidet sich von den bisher bekannten rekombinanten PDGF-AB Produkten in erster Linie durch seinen hohen Reinheitsgrad. Wie eingangs ausgeführt, ist bisher kein rekombinantes Verfahren beschrieben worden, bei dem 90% und mehr des erhaltenen Produktes aus dem Heterodimeren besteht. Da die vollständige Abtrennung der Homodimeren von dem Heterodimeren nahezu unmöglich ist, sind die bekannten Produkte zwangsläufig Gemische aus allen 3 Isoformen.

25 Darüberhinaus haften den bekannten Produkten, abhängig von deren Herstellung, in mehrfacher Hinsicht Nachteile an. So ist es bekannt, daß die heterologe Genexpression in Hefezellen, wie in EP 259 632 oder 288 307 beschrieben, zu Proteinprodukten mit gegenüber dem humanen Produkt veränderten Glykosylierungsmustern 30 führt. Zudem ist in Hefezellen exprimierte PDGF-B zumindest teilweise unvollständig prozessiert und/oder proteolytisch abgebaut (vgl. WO 912/01716). Derartige Produkte weisen somit ein verändertes Kohlenhydratmuster auf, und sie sind mit proteolytischen Abbauprodukten verunreinigt. Zur Vermeidung der vorgenannten Nachteile beschreibt die WO 92/01716 Verfahren zur Herstellung modifizierter PDGF-Ketten, bei denen die Konsensus-

- 19 -

Sequenzen für die Glykosylierung bzw. die Protease sensitiven Domänen entfernt sind. Derartige Modifikationen beeinflussen jedoch die biologische Aktivität des Produktes (vgl. WO 92/01716).

5

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird durch Kultivieren von erfindungsgemäß transformierten BHK-Zellen, beispielsweise durch Kultivieren derjenigen Zellen, welche unter der Bezeichnung 92-22-6 entsprechend DSM ACC 2048 10 oder 92-22-7 entsprechend DSM ACC 2049 am 11. 8. 1992 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) hinterlegt wurden, heterodimeres rPDGF-AB gewonnen.

Zwar ist aus der WO 90/08163 die rekombinante Herstellung von 15 PDGF-AB in Bakterienzellen, insbesondere in *E. coli* bekannt, welche zwangsläufig zu einem nicht glykosylierten Produkt führt. Eine nach diesem Verfahren in *E. coli* Zellen exprimierte PDGF-B Kette ist jedoch aminoterminal um 12 Aminosäuren verkürzt. Darüberhinaus muß das Produkt aus Bakterien *in vitro* renaturiert 20 werden, ein Vorgang, bei dem die korrekte inter- und intramolekularen Bildungen der Disulfidbrücken und die korrekte Faltung des Proteins nicht gewährleistet ist, mit der Folge, daß die immunologischen Eigenschaften des Produkts verändert und die biologische Aktivität beeinflußt werden können.

25

Das heterodimere rPDGF-AB gemäß der Erfindung wird vorzugsweise zusammen mit pharmazeutisch verträglichen Hilfs- und Trägerstoffen als pharmazeutisches Präparat, insbesondere für die Wundheilung formuliert. In diesem Zusammenhang kann es als Wirkstoff in 30 Pflastern, Wundverbänden und dergleichen enthalten sein. Es ist besonders für die topische Verabreichung geeignet, es kommen jedoch auch Applikationen in Betracht, in deren Verlauf der Wirkstoff in die Wunde eingebracht oder subkutan verabreicht wird. Beispielsweise kann das PDGF-AB in einer geeigneten Matrix 35 mit Depotfunktion im Wundrandbereich subkutan appliziert werden oder direkt subkutan injiziert werden.

Ferner eignet sich das erfindungsgemäße heterodimere rPDGF-AB zur Herstellung von kosmetischen Präparaten, zum Beispiel zur Hautregeneration, zur Hautglättung, zur Verhinderung der Narbenbildung oder der Hautalterung sowie zur Anwendung bei Sonnenbrand.

Geeignete Hilfs- und Trägerstoffe schließen Cellulose-Gele auf wässriger Basis, biologisch abbaubare Polymere sowie jegliche Salben- und Cremebasis und Sprays ein. Ferner können zusätzliche Wirkstoffe, welche die Wundheilung beeinflussen, wie beispielsweise Kollagen, Fibronektin, Faktor XIII, Fibroblasten Wachstumsfaktor (aFGF, bFGF), Transformierender Wachstumsfaktor Typ  $\alpha$  oder  $\beta$ , Epidermis Wachstumsfaktor, Insulin oder Insulin-Like Growth Factor (IGF I, II) oder weitere Wachstumsfaktoren in den erfindungsgemäßen Präparaten enthalten sein. Die erfindungsgemäß Produkten können beispielsweise auch in Wundverbänden in wässriger Lösung vorliegen.

Wie oben dargelegt liegt der Erfindung die Erkenntnis zugrunde, daß durch den Einbau einer bestimmten Sequenz "Y" die IRES-abhängige Translation von C<sub>2</sub> so gesteigert werden kann, daß sie die "cap"-abhängige Translationseffizienz erreicht. Die Sequenz "Y" ist demgemäß in der Lage, mit der IRES so zu kooperieren, daß es zu einer Steigerung der IRES-abhängigen Translationsinitiation kommt, welche mindestens der Effizienz der cap-abhängigen Translationseffizienz entspricht. Sequenzen "Y", welche diese Funktion erfüllen, sind oben ausführlich beschrieben. Patentgemäß wird die  $\beta$ -Globin 5'UTR aus *Xenopus laevis* bevorzugt.

Weitere Sequenzen, welche die erfindungsgemäßen Voraussetzungen erfüllen, lassen sich nach einem Verfahren ermitteln, bei dem zum Auffinden von translations-beeinflussenden Sequenzen "Y", welche im Zusammenwirken mit IRES in Expressionseinheiten nach der Erfindung die äquimolare Expression der Genprodukte von C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> bewirken,

- 5                 (a) die zu untersuchenden Sequenzen als Y in bi- oder multicistronische Expressionseinheiten eingebracht werden, in denen C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> jeweils ein Reportergen enthalten, wobei diese Gene für verschiedene und leicht voneinander differenzierbare Genprodukte kodieren,
- 10                 (b) Vektoren konstruiert werden, welche die jeweilige Expressionseinheit operativ insertiert enthalten,
- 15                 (c) Säugerzellen als Wirtszellen mit den Vektoren aus Stufe (b) transformiert und in einem geeigneten Medium kultiviert werden, und
- 20                 (d) die Expressionsprodukte von C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> in dem Medium oder nach Abtrennen von den Zellen und/oder dem Medium quantifiziert werden.

Vorzugsweise werden in Stufe (c) CHO- oder BHK-Zellen als Wirtszellen verwendet werden, wobei BHK-21-Zellen besonders bevorzugt sind.

Alternativ können weitere IRES Sequenzen, welche die erfindungsgemäßen Voraussetzungen erfüllen, nach einem Verfahren ermittelt werden, bei dem man zum Auffinden von translations-initiiierenden Sequenzen IRES, welche im Zusammenwirken mit "Y" in Expressionseinheiten nach den Ansprüchen 1 bis 15 die äquimolare Expression der Genprodukte von C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> bewirken,

- 30                 (a) die zu untersuchenden Sequenzen als IRES in Expressionseinheiten einbringt, in denen C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> jeweils ein Reportergen enthalten, wobei diese Gene für verschiedene und leicht voneinander differenzierbare Genprodukte kodieren,

- 22 -

- (b) Vektoren konstruiert, welche die jeweilige Expressionseinheit operativ insertiert enthalten,
- 5 (c) Säugerzellen als Wirtszellen mit den Vektoren aus Stufe (b) transformiert und in einem geeigneten Medium kultiviert, und
- 10 (d) die Expressionsprodukte von C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> in dem Medium oder nach Abtrennen von den Zellen und/oder dem Medium quantifiziert.

Vorzugsweise werden in diesem Verfahren CHO- oder BHK-Zellen als Wirtszellen verwendet und in besonders bevorzugter Weise BHK-Zellen, die als Reportergene die für Luciferase und für sekretorische alkalische Phosphatase kodierenden Gene, (LUC) bzw. (SEAP), enthalten.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Figuren und Beispielen erläutert.

I. Beschreibung der Figuren:

Fig. 1) Herstellung der Basisvektoren pSBC-1 und pSBC-2

5 Für die Konstruktion des Vektors pSBC-1 wurde ein 627 bp *MseI/BalI*-Fragment aus dem Plasmid pGEM3-5'Polio (M) (Sarnow, 1989) als Matritze für eine PCR mit folgenden Primern verwendet (Fig. 1):

10 5'-Poliol     <sup>5'</sup>TTT CTGCAG AAGCTT AAAACAGCTCTGGGG<sup>3'</sup> (SEQ ID Nr. 14)  
                  PstI   HindIII

3'-Polio2     <sup>5'</sup>TT GCGGCCGC AATCCAATTGCGCTTATG<sup>3'</sup> (SEQ ID Nr. 15)  
                  NotI

15

Das nach der Amplifikation erhaltene 652 bp Fragment wurde mit Pol I K behandelt, anschließend mit PstI gespalten und in den entsprechend präparierten Vektor pBEH (Artelt et al., 1988) insertiert. Für die Konstruktion des Vektors pSBC-2 wurde das  
20 Plasmid pBEH mit EcoRI linearisiert und die folgenden Oligonukleotid-sequenzen hybridisiert und insertiert:

E-N-E1         <sup>5'</sup>AATT GCGGCCGC G<sup>3'</sup> (SEQ ID Nr. 16)  
E-N-E2         <sup>3'</sup>CGCCGGCG CTTAA<sup>5'</sup> (SEQ ID Nr. 17)

25

Fig. 2A und B) Konstruktion der Expressionsvektoren pSBC-LUC/SEAP und pSBC-SEAP/LUC

30 Die kodierenden cDNA-Sequenzen der Gene für Luciferase und sekretierte alkalische Phosphatase wurden unter Verwendung von EcoRI/HindIII Restriktionen in die monocistronischen Vektoren pSBC-1 und -2 insertiert (Fig. 2A und 2B). Die Fusion beider Vektoren zu einer bicistronischen Expressionseinheit wurde mit  
35 Hilfe der Restriktionsenzyme XmnI/NotI durchgeführt.

- 24 -

Fig. 2C) Konstruktion der Plasmide pSBC-SEAP/-G-LUC und pSBC-LUC/-G-SEAP

Die Expressionskonstrukte pSBC-SEAP/-G-LUC und pSBC-LUC/-G-SEAP 5 leiten sich aus den in Fig. 2A und 2B dargestellten Plasmiden ab. Sie enthalten zusätzlich das Oligomer G (SEQ ID Nr. 6), das in die singuläre NotI-site ligiert wurde. Das Oligomer G ist so konstruiert, daß durch Ligation in die NotI-site die 5'-NotI-site verloren geht (eine SalI-site ist hier enthalten), aber die 10 3'-NotI-site erhalten bleibt.

Fig. 3) Schematische Darstellung des Vektors M13BCL1

In der Vektorkarte ist der *c-sis* (PDGF-B) homologe Bereich aus 15 pMVW-2 angegeben. Der Bereich des reifen PDGF-B und der NcoI/SalI Adapter sind durch schwarze Balken hervorgehoben.

Fig. 4) Rekonstitution der vollständigen PDGF-B-Vorläufersequenz

20 Das Plasmid pMVW-2 enthält die cDNA des humanen PDGF-B Gens, welches im 5'-translatierten Bereich der Vorläufersequenz unvollständig ist (Weich et al., 1986). Für die Rekonstitution des authentischen PDGF-B precursors wurde in den 5'-terminalen Bereich des Vorläufers durch einen C-T-Austausch in Position 30 25 des codogenen Abschnittes des Klons pMVW-2 eine BclI-Schnittstelle eingeführt. Durch diesen Schritt geht letztlich nur ein kurzer Abschnitt des kodierenden Bereiches verloren und die lokal codierte Aminosäure (Asparaginsäure) bleibt dabei erhalten. Da die BclI-Schnittstelle in den meisten *E.coli*-Stämmen 30 durch Methylierung resistent gegenüber enzymatischer Spaltung ist, muß das diese Schnittstelle enthaltene Fragment entweder in einen dam<sup>-</sup>-Stamm umkloniert, oder über einen PCR-Schritt amplifiziert werden. Der fehlende Bereich des Vorläufers wird dann als synthetisches SalI/BclI-Fragment [Oligomere PPDGFB1 und PPDGFB2] 35 eingesetzt.

Hierfür wurde zunächst das 914 bp BamHI/NcoI-Fragment aus pMVW-2 über einen synthetischen Adapter [Oligomere NCCLSA1, SEQ ID Nr. 9 und NCCLSA2, SEQ ID Nr. 10] in den BamHI/SalI-gespaltenen Bakteriophagen M13mp19 (Pharmacia) insertiert. Dieses Konstrukt 5 lieferte die notwendige Einzelstrang-DNA für den nachgeschalteten *in vitro* Mutageneseschritt, der mit Hilfe des Oligomer-directed *in vitro* mutagenesis system (Version 2) der Fa. Amersham, basierend auf der Methode von Eckstein et al. [Taylor et al., (1985), Nakamaye K. und Eckstein F. (1986), Sayers et al. 10 (1988)] durchgeführt wurde. Durch den synthetischen Primer PDGBBCL (SEQ ID NR. 11) wird nach der Mutagenese ein Basenaustausch (C zu T) in Position 144 der unter SEQ ID Nr. 3 dargestellten Sequenz erreicht und dadurch im 5'-Bereich des PDGF-B precursors eine BclI-Schnittstelle eingeführt. Dieses Mutagene- 15 sederivat wurde als M13BCL1 bezeichnet (Fig. 3).

Ein 1100 bp Fragment aus M13BCL1 wurde über einen PCR-Schritt mit Hilfe der Primer M1317MER (SEQ ID Nr. 7) und M1324MER (SEQ ID Nr. 8) amplifiziert, anschließend einer BclI/HindIII-Restriktion unterworfen und das resultierende 770 bp Fragment isoliert. 20 Die synthetischen Oligomere PPDGFB1 (SEQ ID Nr. 12) und PPDGFB2 (SEQ ID Nr. 13) bilden den fehlenden 5'-Bereich des PDGF-B-Vorläufers bis zur BclI-Schnittstelle. Nach dem Annealing wurde dieses doppelsträngige Oligomer anschließend, zusammen mit dem 770 bp PDGF-B Fragment, in den mit einer SalI/HindIII Restriktion 25 vorbereiteten Vektor pGEM-2 (Promega) ligiert (Fig. 4). Die authentische Sequenz von PDGF-B wurde durch vollständige Sequenzierung verifiziert.

Fig. 5) Herstellung einer sekretorischen PDGF-B-Kette

30 Die Expression des PDGF-B Gens über monocistronische Expressionsvektoren ist in BHK-Zellen geringer als die von PDGF-A. Die Ursache hierfür ist, daß PDGF-BB extrazellulär an der Plasmamembran der Produzentenzelle zurückgehalten und nur zu einem 35 geringen Teil in das Medium abgegeben wird (La Rochelle et al., 1991; Östmann et al., 1991). Die Retention von PDGF-B wird durch

den carboxyterminalen Bereich, der bei der Freisetzung von PDGF-B natürlicherweise abgespalten wird, vermittelt (La Rochelle et al., 1991). Für die Herstellung einer besser sekretierbaren PDGF-B Variante wurde eine PCR-vermittelte Mutagenese durchgeführt, bei der ein Stopcodon an der Aminosäure in Position 191 des PDGF-B-precursors (Arg) eingefügt wurde. In der so hergestellten Mutante (PDGF-B190, SEQ ID Nr. 24) wird der für die Retention verantwortliche Bereich nicht exprimiert. Das 610 bp lange PCR-Produkt wurde unter Verwendung folgender Primer erhalten (Fig. 5):

15

Fig. 6A und B) Konstruktion der Expressionsvektoren pSBC-PDGF-A/B und pSBC-PDGF-B/A

Die vollständige codierende cDNA für den PDGF-B precursor (Ratner et al., 1985) liegt in dem Vektor pGEM2-PDGF-B vor (Fig.4). Die vollständige cDNA-Sequenz der kurzen Variante der PDGF-A-Kette (Betsholtz et al., 1986) ist im Expressionsvektor pODA (Eichner et al., 1989) enthalten. Dieser Vektor wurde erhalten durch Klonierung des RsaI-Fragments aus pPGF-1 (Hoppe et al., 1987) in den SV-40 Expressionsvektor pBEH (Artelt et al., 1988). Die kodierenden cDNA-Sequenzen der PDGF-A- und -B-Kette wurden unter Verwendung von EcoRI/HindIII Restriktionen in die monokiströnischen Vektoren pSBC-1 und -2 (Fig. 1) insertiert. Die Fusion beider Vektoren zu einer biciströnischen Expressionseinheit wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme XmnI/NotI durchgeführt (Fig. 6A, 6B).

Fig. 6C) Schematische Darstellung der Plasmide pSBC-PDGF-A/-G-B190 und pSBC-PDGF-B190/-G-A

- 27 -

Die Expressionskonstrukte pSBC-PDGF-A/-G-B190 und pSBC-PDGF-B190/-G-A leiten sich aus den in Fig. 6A und 6B dargestellten Plasmiden ab. Sie enthalten zusätzlich das Oligomer G (SEQ ID Nr. 6), das in die singuläre NotI-site ligiert wurde. Das Oligomer G ist so konstruiert, daß durch Ligation in die NotI-site die 5'-NotI-site verloren geht (eine SalI-site ist hier enthalten), aber die 3'-NotI-site erhalten bleibt.

Fig. 7) Sandwich-ELISA zum Nachweis von PDGF-A- bzw. PDGF-B-10 Kette mit Hilfe von zwei polyklonalen Anti-PDGF-Antikörpern: Eichkurven von PDGF-Standards.

Polystyrolplatten wurden mit Ziege-Anti-PDGF-AB-IgG (polyklonal, von Collaborative Research) beschichtet; nach Inkubation mit 15 verschiedenen PDGF-Standards (s. unten) wurde gebundenes PDGF mit Hilfe von polyklonalem Kaninchen-Anti-PDGF-AA bzw. -Anti-PDGF-BB, gefolgt von Peroxidase-markiertem Anti-Kaninchen-IgG detektiert.

Bei der Anwendung von Anti-PDGF-AA (ELISA I.1) erhält man O.D.-20 Signale in der Reihenfolge: PDGF-AB > PDGF-AA >> PDGF-BB (7.1). Mit Anti-PDGF-BB (ELISA I.2) ergeben sich maximale O.D.-Werte für PDGF-AB und -BB ab 10 ng/ml, PDGF-AA liefert bis 1000 ng/ml kein Signal (7.2).

[Quelle der Standards: AB: aus humanen Thrombozyten, von Promega Corp. No. G 6191; BB: rekomb. aus Hefe, von Promega Corp. No. G 5191; AA: rekomb. aus BHK-Zellen, ca. 70 %ig, (Eichner et al., 1989)].

Fig. 8) Sandwich-ELISA zum Nachweis von PDGF-AB mit Hilfe eines 30 monoklonalen und eines polyklonalen Anti-PDGF-Antikörpers: Eichkurven von PDGF-Standards.

Polystyrolplatten wurden mit Schaf-Anti-Maus-IgG beschichtet und anschließend mit einem Maus-Hybridoma-Überstand (von Klon 1B3, 35 enthält monoklonale Antikörper gegen die B-Kette in PDGF-AB und -BB) inkubiert; nach Inkubation mit verschiedenen PDGF-Standards

(s. Legende zu Fig. 7) wurde PDGF-AB mit Hilfe eines polyklonalen Kaninchen-Anti-PDGF-AA, gefolgt von Peroxidase-markiertem Anti-Kaninchen-IgG nachgewiesen.

Für PDGF's aus eukaryontischen Quellen ergibt sich ein spezifisches Signal mit PDGF-AB (aus humanen Thrombozyten) mit einer geringen Kreuzreaktion mit PDGF-BB.

Fig. 9) Nachweis von PDGF-A-Kette bzw. B-Kette in Kulturerstaenden von rekombinanten BHK-Zellen mittels ELISA I:

10

Eichkurven von Standards s. Fig. 7.1 und 2; die Proben stammten von BHK-Zellen, die mit folgenden Genen transfiziert worden waren:

Probe 1: pSBC-2-PDGF-A; Probe 2: pSBC-2-PDGF-B ; Probe 3: pSBC-  
15 2-G-PDGF-B190; Probe 4: pSBC-PDGF-A/B; Probe 5: pSBC-PDGF-B/A;  
Probe 6: pSBC-PDGF-A/-G-B190 Probe 7: pSBC-PDGF-B190/-G-A; Probe  
8: pSBC-2-PDGF-A + pSBS-2-PDGF-B; Probe 9: pSBC-2-PDGF-A + pSBC-  
2-G-PDGF-B190; Probe 10: pSBC-Luc/-G-Seap; Probe 11: pSBC-Seap/  
G-Luc.

20

Tabelle 1) Steigerung der Expression von Reportergenen durch eine insertierte zelluläre Sequenz (Globin) in mono- und biciströnischen Vektoren

25 links: schematische Darstellung der DNA-Konstrukte

	DNA	erwartete Größe der mRNA
30 1)	pSBC-2-LUC	1870 nt
2)	pSBC-1-LUC	2497
3)	pSBC-2-G-LUC	1904
4)	pSBC-1-G-LUC	2531
5)	pSBC-SEAP/LUC	4407
6)	pSBC-G-SEAP/LUC	4441
35 7)	pSBC-SEAP/G-LUC	4441
8)	pSBC-SEAP/LUC (Delta) Polio	3780
9)	pSBC-LUC/SEAP	4407

- 29 -

L = Strukturgen für Luciferase  
S = Strukturgen für sekretierte alkalische Phosphatase  
IRES = "internal ribosomal entry site"  
G = Sequenz aus *Xenopus laevis* Globin mRNA  
5 pA = poly Adenylierungssite aus SV40

Mitte: Northern Blot Analyse

10 Die mRNA aus dem Gesamtpool der BHK-Zellen, die stabil mit den monocistronischen und bicistronischen Expressionskonstrukten für LUC und SEAP transfiziert worden waren, wurde untersucht. Die RNA wurde nach Purchio et al. (1979) isoliert, über ein 1%iges Agarose-Formaldehydgel fraktioniert (Lehrach et al., 1977), auf 15 eine Nylonmembran geblottet und mit [<sup>32</sup>P]-markierten Actin-, LUC- und SEAP-spezifischen Sonden hybridisiert. Erwartungsgemäß zeigen die monocistronischen mRNAs eine Größe von etwa 1900 - 2500 nt, während bei den bicistronischen mRNAs die Größe der codierenden Sequenzen beider Reportergene (etwa 3800 - 4400 Nucleotide) vorhanden ist. Hiermit ist gezeigt, daß die entsprechenden Genprodukte von einer einzigen bicistronischen mRNA abgelesen werden.

rechts: Ergebnisse für Luciferase- und SEAP-Expression

25 Die Ergebnisse wurden ermittelt, wie unter 1.1 und 1.2 beschrieben.

30 Tabelle 2) Produktivität der mono- und bicistronischen Expressionsvektoren für die PDGF-Ketten A und B in BHK-Zellen

Die PDGF-Konzentration in den Kulturüberständen wurde mit Hilfe des Mitogentests ermittelt. Der spezifische Nachweis von PDGF-AB 35 erfolgte durch ELISA II (s. 2.3, Eichkurven von Standards s. Fig. 8).

- 30 -

## II. Beispiele:

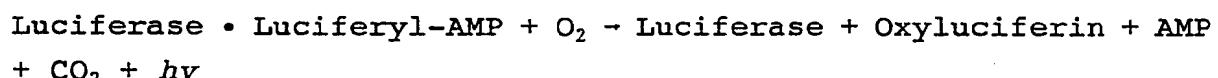
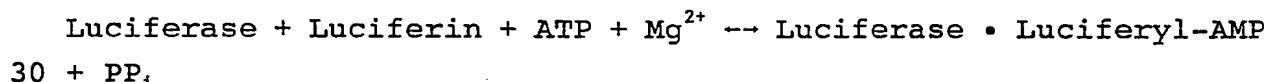
Die in den Beispielen aufgeführten Anwendungen zur Expression basieren auf monocistronischen und bicistronischen Transkriptionseinheiten. Die zu exprimierenden Gene werden jeweils in die Vektoren pSBC-1 bzw. pSBC-2 integriert. Die Vektorkonstruktion vereinfacht das Rekombinieren von pSBC-1 und pSBC-2 zum bicistronischen Vektor, wie es in den Fig. 2A - 2C für die Expression der Gene LUC und SEAP und in den Fig. 6A - 6C am Beispiel der Gene von PDGF-A und PDGF-B gezeigt ist. Nach Transfer des Plasmids pSBC-PDGF-A/-G-B190 (G =  $\beta$ -Globin-Sequenz aus *Xenopus laevis* gemäß SEQ ID Nr.4) in Animalzellen wird PDGF-A cap-abhängig und PDGF-B in Abhängigkeit vom Polio-IRES translatiert. In entsprechender Weise werden pSBC-PDGF-B190/-G-A sowie die Reportergene LUC und SEAP von mono- bzw. bicistronischen mRNA-Molekülen translatiert.

**Beispiel 1:** Expression der Reportergene LUC und SEAP mit Hilfe des bicistronischen Vektorsystems

20

### 1.1 Nachweisverfahren für Luciferase

Die Luciferase ist in Zellextrakten enthalten. Ihre Aktivität kann durch Zugabe von Luciferin (Substrat), ATP und  $Mg^{2+}$  quantitativ bestimmt werden und als Maß der Aktivität des Luciferasegens gelten. Dabei spielt sich folgende Reaktion ab (de Wet et al., 1987):



### 35 1.2 Nachweisverfahren für sekretierte alkalische Phosphatase

Alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das die Hydrolyse von gebundenem Phosphat katalysiert. Das membranständige, in Eukaryonten vorkommende Enzym verfügt über einen Glykophospholipidanker, mit dem es C-terminal mit der Membran verbunden ist. Da sezernierte Proteine oft bequemer nachweisbar sind als zellinterne oder membranständige, wurde in die Sequenz der alkalischen Phosphatase aus humaner Placenta (513 Aminosäuren) an Position 489 ein künstliches Terminations-Translationssignal eingeführt (Berger et al., 1988). Die nach Transfektion des entsprechenden Expressionsplasmids hergestellte Proteinmutante wird effizient ins Medium sekretiert und eignet sich hervorragend als Reportermolekül (SEAP = sekretierte alkalische Phosphatase). Der Nachweis kann kolorimetrisch oder luminometrisch erfolgen (Berger et al., 1988).

15

### 1.3 Herstellung transformierter BHK-Zellen

Die Transfektion der mono- und bicistronischen Expressionsvektoren, die die codierenden Sequenzen der Reportergene LUC und SEAP bzw. der PDGF-A- und B-Kette tragen (vergl. Fig. 2A-C, 6A-C) wurde mit der Calciumphosphat-Präzipitationstechnik in BHK-Zellen durchgeführt (Wigler et al., 1979; Graham & van der Eb, 1973). Einen Tag vor der Transfektion wurden  $2-3 \times 10^5$  BHK-Zellen/24 cm<sup>2</sup> in neue Kulturflaschen umgesetzt. Vier Stunden vor der Transfektion wurde ein Medienwechsel mit DME-Medium durchgeführt. 5 µg der o. g. Plasmid-DNA wurden zusammen mit 0,5 µg der Selektionsplasmide pAG60 und pSV2pac (Colbérę-Garapin, 1981; Vara et al., 1986), welche für ein Neomycinresistenzgen bzw. für eine Puromycin-Resistenz kodieren, wurden in 250 µl 250 mM CaCl<sub>2</sub> suspendiert. Die Lösung wurde langsam unter ständiger Verwirbelung durch steril eingekochte Luft zu 250 µl 2 x HEPES-Puffer (280 mM NaCl; 50 mM HEPES; 1,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,1) gegeben und das erhaltene Präzipitat dem Nährmedium zugesetzt. Zwei Tage nach der Transfektion wurde durch Medienwechsel von DME- auf Doppel Selektionsmedium (5 µg/ml Puromycin; 500 µg/ml G418)

(Wirth et al., 1988) die Selektion auf stabil transfizierte Zellen begonnen. Repräsentative Klone der PDGF produzierenden bzw. LUC/SEAP produzierenden BHK-Zellen wurden am 11. 8. 1992 bei der DSM wie folgt hinterlegt:

5

- pSBC-PDGF-A/-G-B190 = DSM ACC2048
- pSBC-PDGF-B190/-G-A = DSM ACC2049
- pSBC-SEAP/-G-LUC = DSM ACC2046
- pSBC-G-SEAP/LUC = DSM ACC2047

10

1.4 Expression äquimolarer Mengen der Genprodukte LUC und SEAP durch Einführung einer translationssteigernden Sequenz vor das IRES-regulierte Cistron

15 Die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit den Reportergenkonstrukten pSBC-LUC/SEAP und pSBC-SEAP/LUC in Tab. 1 zeigen, daß die Expression der IRES-abhängigen Translation im bicistronischen Konstrukt immer deutlich geringer ist als die im cap-abhängig translatierten Cistron. Dies entspricht den aus der  
20 Literatur bekannten Werten. Die  $\beta$ -Globin Sequenz aus *Xenopus laevis* (SEQ ID Nr. 6) wurde in den mono- und bicistronischen Reportergenkonstrukten in die singuläre NotI-Schnittstelle inseriert (Fig. 2C). In den bicistronischen Expressionsvektoren befindet sie sich unmittelbar zwischen Promotor und 5'UTR des  
25 ersten Cistrone bzw. zwischen dem IRES-Element und dem 5'-UTR des zweiten Cistrone.

Die Steigerung der Translationseffizienz der einzelnen Cistrone wurde anhand der Reportergenkonstrukte, wie sie in Fig. 2A - 2C dargestellt sind, gemessen. In Tabelle 1 ist gezeigt, daß die  $\beta$ -  
30 Globin-Sequenz die cap-abhängige Translation von Luciferase in der monocistronischen Expressionseinheit um den Faktor 5, die IRES-abhängige Translation in bicistronischen Expressionseinheiten um den Faktor 3 stimuliert. Letzteres führt zur äquimolaren Expression der Cistrone 1 und 2 in bicistronischen Vektoren.  
35 Der in der Tabelle 1 dargestellte Northern Blot zeigt, daß die entsprechenden Genprodukte von einer mono- bzw. bicistronischen

mRNA abgelesen werden. Dadurch, daß die spezifischen mRNA-Konzentrationen in der gleichen Größenordnung in den Zellen vorhanden sind, ist bewiesen, daß die expressionssteigernde Wirkung der Globinsequenz sich auf der Ebene der Translation vollzieht.

5

Die äquimolare Expression der Genprodukte des ersten und zweiten Cistrons wurde durch das Einführen des 5'UTR des Globingens aus *Xenopus laevis* (SEQ ID Nr. 6) erreicht.

10 **Beispiel 2:** Expression von PDGF-AB Heterodimer mit Hilfe des bicistronischen Vektorsystems

2.1 Gewinnung konditionierter Zellkulturüberstände

15 Die Transformation der BHK-Zellen erfolgte analog 1.3. Nach dem Auszählen der Kolonien werden die Zellen abtrypsinisiert, in frischem Selektionsmedium aufgenommen und auf eine Zellzahl von  $10^5$  Zellen/ml eingestellt. Je 10 ml dieser Zellsuspension werden in eine Flasche mit  $65 \text{ cm}^2$  Bodenfläche überführt und für weitere 20 24 h kultiviert. Danach wird das Medium entfernt, der Zellrasen 2x mit PBS gewaschen und das Medium durch 10 ml Produktionsmedium (DMEM, ohne Serum und Selektions-Antibiotika) ersetzt. Nach 24 h wird das Medium abgenommen. Die geernteten Überstände werden bis zur Analyse bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Die Zellen werden ge-25 zählt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Zeitpunkt der Ernte beträgt die Zellzahl/Flasche  $0.8-1.2 \times 10^7$ .

2.2 Nachweis von PDGF in den Kulturüberständen mit Hilfe des  
30 Mitogentests

Die Messung der Stimulierung der DNA-Syntheserate von dichtear-  
retierten Fibroblasten erlaubt eine Bestimmung der mitogenen Aktivität des PDGF. Eine Unterscheidung zwischen den Isoformen 35 ist dabei nicht möglich, da alle PDGF-Spezies in diesem Test biologisch aktiv sind.

Der Assay wurde gemäß Shipley et al. (1984) mit AKR-2B-Mausfibroblasten in 24-Well-Platten durchgeführt. Reines PDGF zeigt in dem Test eine halbmaximale Stimulierung bei einer Konzentration von etwa 5 ng/ml. Dieser Wert wurde benutzt, um Produktivitäten 5 zu bestimmen. Die Ergebnisse aus dem Mitogentest sind in Tab. 1 den Werten aus dem PDGF-AB-ELISA gegenübergestellt.

2.3 Nachweis von PDGF-AB Heterodimer in den Kulturüberständen mit Hilfe von PDGF-ELISA's

10

Es wurden zwei 'two-antibody sandwich assays' aufgebaut, die I.) eine grobe Quantifizierung der PDGF-A- bzw. der -B-Kette in PDGF-Dimeren und II.) eine spezifische Quantifizierung von PDGF-AB neben PDGF-AA und -BB erlauben.

15

I. Sandwich-Assay mit Hilfe von zwei polyklonalen Anti-PDGF-Antikörpern

20 Polystyrolplatten mit 96 Kavitäten (Fa. Dynatech, U-Platte, No. M124B) werden in folgender Reihenfolge beschichtet (zwischen jedem Schritt jeweils 4 x Waschen mit PBS mit 0,05 % Tween 20):

25 I.1 Polyclonales Ziege-Anti-PDGF-AB-IgG (Fa. Collaborative Research, No. 40017); bindet PDGF-AB, -BB und in geringem Maße -AA), 2 µg/ml in 0,05 M Carbonat/Bicarbonat-Puffer, 50 µl über Nacht bei 4 °C

30 I.2 % BSA (Fa. E. Merck, Nr. 12018) in PBS, pH 7,5, 100 µl für 1 h bei R.T.

I.3 PDGF-haltige Lösungen, verdünnt in PBS mit 0,1 % BSA und 0,05 % Tween 20 (PBS+), 50 µl für 1 h bei R.T.

I.4.1 Polyklonales Kaninchen-Anti-PDGF-AA-IgG (Fa. Genzyme, No. ZP-214, bindet an der A-Kette von dimerem PDGF), 2 µg/ml in PBS+, 50 µl für 1 h bei R.T. (ELISA I.1) bzw.

5 I.4.2 Polyklonales Kaninchen-Anti-PDGF-BB-IgG (Fa. Genzyme, No. ZP-215, bindet an der B-Kette von dimerem PDGF), wie I.4.1 (ELISA I.2)

10 I.5 POD-markiertes Ziege-Anti-Kaninchen IgG (Fa. Pierce, No. 31460), 0,1 µg/ml in PBS+, 50 µl für 1 h bei R.T., Detektion mit dem Substrat Tetramethylbenzidin gemäß E.S. BOS et al. (J. Immunoassay 2 (1981), 187-204).

15 II. Sandwich-Assay mit Hilfe eines monoklonalen und eines polyklonalen Anti-PDGF-Antikörpers

Dieselben Platten wie im ELISA I werden in folgender Reihenfolge beschichtet (Mengen, Puffer und Inkubationszeiten wie oben):

II.1 Schaf-Anti-Maus-IgG (Fa. Boehringer Mannheim, Nr. 1097 105), 3 µg/ml.

25 II.2 1 % BSA in PBS

II.3 Maus-Hybridoma-Überstand von Klon 1B3 [erhalten durch Fusion von SP2/O-Myelomzellen mit Milzzellen von Mäusen, die mit rekomb. PDGF-AB (aus *E.coli* gemäß J. Hoppe et al., 1990) immunisiert worden waren], 2 µg/ml IgG2a/ml. Der monoklonale Antikörper bindet spezifisch an der B-Kette von PDGF-Dimeren.

II.4 PDGF-haltige Lösungen

II.5 Polyklonales Kaninchen-Anti-PDGF-AA-IgG (s. I.4.1), 2 µg/ml

II.6 wie I.5

5

2.4 Expression äquimolarer Mengen der PDGF-Ketten A und B durch Einführung einer translationssteigernden Sequenz vor das IRES-regulierte Cistron

10 Bicistronische Konstrukte mit dem wie in Fig. 5 beschriebenen mutierten PDGF-B sollten zur Expression der PDGF-Ketten A und B im Verhältnis 3:1, entsprechend der Konstellation im bicistronischen Vektor führen. Die äquimolare Expression beider Gene wurde durch das Einführen von translationssteigernden Sequenzen  
15 in den 3'- Bereich der internen ribosomalen Eintrittsstelle des Polio-Elements erreicht. Ein solches Element ist z.B. die β-Globin-Sequenz aus *Xenopus laevis* (SEQ ID Nr. 6). Diese β-Globin-Sequenz (Oligomer G) wurde in den bicistronischen Vektoren in die singuläre NotI-Schnittstelle insertiert (Fig. 6C). In den  
20 daraus resultierenden Plasmiden befindet sie sich unmittelbar zwischen dem IRES-Element und dem 5'-UTR des zweiten Cistrone.

2.5 Ergebnisse:

25 In Figur 9 und Tabelle 2 sind die Resultate von drei unterschiedlichen Analysen für PDGF aus Kulturüberständen rekombinanter BHK-Zellen dargestellt.

Durch den ELISA I ist es möglich, eine grobe Aussage über die Mengenanteile beider PDGF-Ketten zu treffen. Somit können Rück-  
30 schlüsse auf die Effizienz der intercistronischen Elemente ge- macht und bicistronische Konstrukte charakterisiert werden, in denen annähernd gleiche Mengen von PDGF-A und -B translatiert werden. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, daß in ELISA I.1 PDGF-AB ein stärkeres Signal als PDGF-AA ergibt.

35 Der Mitogentest liefert einen brauchbaren Wert für die Gesamtmenge des in den Kulturüberständen vorhandenen rPDGF, ohne zwi-

schen den verschiedenen Isoformen (PDGF-AA, AB oder BB) differenzieren zu können.

Der spezifische Anteil an heterodimerem PDGF-AB kann durch den PDGF-AB-spezifischen ELISA II bestimmt werden. Aus der Differenz dieser Analyse zum Ergebnis des Mitogentests kann der prozentuale Anteil von PDGF-Homodimeren mit hoher Genauigkeit ermittelt werden.

**Abkürzungen:**

5	B190	-	C-terminal verkürzter PDGF-B-precursor (DNA)
	B*	-	PDGF-B-Kette (Protein), hervorgegangen aus verkürztem PDGF-B-precursor
10	BHK	-	Hamsterzelllinie
	bp	-	Basenpaar(e)
	BSA	-	Rinderserumalbumin
15	CHO	-	Hamsterzelllinie
	DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
20	ELISA	-	enzyme-linked immunosorbent assay
	G	-	$\beta$ -Globin-Sequenz aus <i>Xenopus laevis</i>
	IgG	-	Immunglobulin der Klasse G
25	IRES	-	internal ribosomal entry site
	LUC	-	Luciferase
30	nt	-	Nukleotid(e)
	PBS	-	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
	PCR	-	Polymerase Kettenreaktion
35	PDGF	-	Wachstumsfaktor aus Thrombozyten
	SEAP	-	sekretierte alkalische Phosphatase
	UTR	-	nicht translatierte Region

## LITERATUR

- Adam M. A., Ramesh N., Miller A. D., and Osborne W. R. A. (1991) J. Virol. 65, 4985-4990.
- 5 Artelt P., Morelle C., Ausmeier M., Fitzek M., and Hauser H. (1988) Gene 68, 213-219.
- Beckmann M. P., Betsholtz C., Heldin C.-H., Westermark B., Di Marco E., Di Fiore P. P., Robbins K. C., and Aaronson S. A. (1988) Science 241, 1344-1349.
- Berger J., Hauber J., Hauber R., Geiger R., Cullen B. R. (1988) Gene 66, 1-10.
- 15 Berkner K. L. and Sharp P. A. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 841-857.
- Betsholtz C., Johnsson A., Heldin C.-H., Westermark B., Lind P., Urdea M. S., Eddy R., Shows T. B., Philpott K., Mellor A. L., Knott T. J., and Scott J. (1986) Nature 320, 695-699.
- Block L. H., Emmons L. R., Vogt E., Sachinidis A., Vetter W., and Hoppe J. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2388-2392.
- 25 Boel E., Berkner K. L., Nexoe B. A., and Schwartz T. W. (1987) FEBS Lett. 219, 181-188.
- Bywater M., Rorsman F., Bongcam-Rudloff E., Mark G., Hammacher A., Heldin C.-H., Westermark B., and Betsholtz C. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 2753-2762.
- 30 Colb  re-Garapin F., Horodniceanu F., Kourilsky P., and Garapin A. C. (1981) J. Mol. Biol. 150, 1-14.
- 35 de Wet, J. R., Wood K. V., DeLuca M., Helinski D. R. and Subramani S. (1987) Mol. Cell. Biol. 7, 725-737.
- Eichner W., J  ger V., Herbst D., Hauser H. and Hoppe J. (1989) 40 Eur. J. Biochem. 185, 135-140.
- Falcone D., and Andrews D.W. (1991) Mol. Cell. Biol. 11 (5), 2656-2664.
- 45 Gallie D. R., Sleat D. E., Watts J. W., Turner P. C. and Wilson T. M. A. (1987A) Nucl. Acids Res. 15, 3257-3272.
- Gallie D. R., Sleat D. E., Watts J. W., Turner P. C. and Wilson T. M. A. (1987B) Nucl. Acids Res. 15, 8692-8711.
- 50 Gallie D. R., Sleat D. E., Watts J. W., Turner P. C. and Wilson T. M. A. (1988) Nucl. Acids Res. 16, 883-893.

- 40 -

- Ghattas I. R., Sanes J. R., and Majors J. E. (1991) Mol. Cell. Biol. 22, 5848-5859.
- Graham F., and van der Eb L. (1973) Virology 52, 456-487.
- Hambidge S. J., and Sarnow P. (1991) J. Virol. 65, 6312-6315.
- Hammacher A., Hellmann U., Johnsson A., Östman A., Gunnarsson K., Westermark B., Wasteson Å., and Heldin C.-H. (1988) J. Biol. Chem. 263, 16493-16499.
- Hart C. E., Forstrom J. W., Kelly J. D., Seifert R. A., Smith R. A., Ross R., Murray M. J., and Bowen-Pope D. F. (1988) Science 240, 1529-1531.
- Hart C. E., Bailey M., Curtis D. A., Osborn S., Raines E., Ross R., and Forstrom J. W. (1990) Biochemistry 29, 166-172.
- Heldin C.-H., Johnsson A., Wennergren S., Wernstedt C., Betscholtz C., and Westermark B. (1986) Nature 319, 511-514.
- Heldin C.-H., Bäckström G., Östman A., Hammacher A., Rönnstrand L., Rubin K., Nister M., and Westermark B. (1988) EMBO J. 7, 1387-1393.
- Hoppe J., Schumacher L., Eichner W. and Weich H.A. (1987), FEBS Lett. 223, 243-246.
- Hoppe J., Weich H. A., and Eichner W. (1989) Biochemistry 28, 2956-2960.
- Hoppe J., Weich H. A., and Eichner W., and Tatje D. (1990) Eur. J. Biochem. 187, 207-214.
- Hosang M., Rouge M., Wipf B., Eggiman B., Kaufmann F., and Hunziker W. (1989) J. Cell. Physiol. 149, 558-564.
- Jackson R. J., Howell M. T., and Kaminski A. (1990) Trends Biochem. Sci. 15, 477-483.
- Jang S. K., Kräusslich H., Nicklin M. J. H., Duke G. M., Palmenberg A. C., and Wimmer E. (1988) J. Virol. 62, 2636.
- Jang S. K., Davies M. V., Kaufmann R. J., and Wimmer E. (1989) J. Virol. 63 (4), 1651-1660.
- Jang S. K., and Wimmer E. (1990) Genes Dev. 4, 1560-1572.
- Jobling S. A. and Gehrke L. (1987) Nature 325, 622-625.
- Johnsson A., Heldin C.-H., Wasteson A., Westermark B., Deuel T. F., Huang J. S., Seeburg P. H., Gray A., Ullrich A., Scrace G., Stroobant P., Waterfield M. D. (1984) EMBO J. 3, 921-928.

- Kaufman R. J. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82, 689-693.
- Kaufman R. J., Murtha P., and Davies M. V. (1987) EMBO J. 6, 187-193.
- 5 Kaufman R. J., Davies M. V. Wasley L. C., and Michnick D. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 4485-4490.
- Kelly J. D., Raines E. W., Ross R., and Murray M. J. (1985) EMBO J. 4, 3399-3405.
- Klausner R. D. and Harford J. B. (1989) Science 246, 870-872.
- Knoechel W., Korge E., Basner A., and Meyerhof W. (1986) J. Mol. Evol. 23, 211-223.
- 15 Kozak M. (1987) Mol. Cell. Biol. 7 (10), 3438-3445.
- Kozak M. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 5134-5142.
- 20 La Rochelle W. J., Giese N., May-Siroff M., Robbins K. C., and Aaronson S. A. (1990) Science 248, 1541-1544.
- La Rochelle W. J., May-Siroff M., Robbins K. C., and Aaronson S. A. (1991) Genes & Development 5, 1191-1199.
- 25 Lehrach H., Diamond D., Wozney J. M., and Boedtker H. (1977) Biochemistry 16, 4743-4751.
- 30 Macejak D. G., and Sarnow P. (1991) Nature (London) 353, 90-94.
- Matoskova B., Rorsman F., Svensson V. and Betsholtz C. (1989), Mol. Cell. Biol. 9, 3148-3150.
- 35 Meerovitch K., Pelletier J., and Sonenberg N. (1989) Genes Dev. 3, 1026-1034.
- Millan, J.L. (1986) J. Biol. Chem. 261, 3112-3115
- 40 Nakamaye K. and Eckstein F. (1986) Nucl. Acids Res. 14, 9679-9698.
- Nister M., Hammacher A., Mellström K., Siegbahn A., Rönnstrand L., Westermark B., and Heldin C.-H. (1988); Cell 52, 791-799.
- 45 Östman A., Rall L., Hammacher A., Wormstead M. A., Coit D., Valenzuela P., Betsholtz C., Westermark B., and Heldin C.-H. (1988) J. Biol. Chem. 263, 16202-16208.
- 50 Östman A., Andersson M., Betsholtz C., Westermark B., and Heldin C.-H. (1991) Cell Regulation 2, 503-512.
- Patient R. K., Harris R., Walmsley M. E. and Williams J. G. (1983) J. Biol. Chem. 258, 8521-8523.

- Pelletier J., and Sonenberg N. (1988) Nature 334, 320.
- Purchio A. F. and Fareed G. C. (1979) J. Virol. 29, 763-769.
- 5 Ratner L., Josephs S. F., Jarrett R., Reitz M. S. and Wong-Staal F. (1985), Nucl. Acids Res. 13, 5007-5018.
- Reilly C. F. and Broski J. E. (1989) Biochem. Biophys. Res. 10 Commun. 160, 1047-1054.
- Robbins K. C., Leal F., Pierce J. H., and Aaronson S. A. (1985) EMBO J. 4, 1783-1792.
- 15 Sachinidis A., Locher R., Vetter W., Tatje D., and Hoppe J. (1990) J. Biol. Chem. 265, 10238-10243.
- Sachinidis A., Locher R., Hoppe J., and Vetter W. (1990) FEBS Lett. 275, 95-98.
- 20 Sarnow P. (1989) J. Virol. 63, 467-470.
- Sayers J. R., Schmidt W. and Eckstein F. (1988) Nucl. Acids Res. 16, 791-802.
- 25 Shipley G. D., Childes C. B., Volkenant M. E. and Moses H. L. (1984) Cancer Res. 44, 710-716.
- Siegbahn A., Hammacher A., Westermark B., and Heldin C.-H. 30 (1990) J. Clin. Invest. 85, 916-920.
- Simoes E. A. F., and Sarnow P. (1991) J. Virol. 65, 913-921.
- Stroobant P., and Waterfield M. D. (1984) EMBO J. 3, 2963-2967.
- 35 Taylor J. W., Ott J. and Eckstein F. (1985) Nucl. Acids Res. 13, 8764-8785.
- Vara J., Portela A., Oritin J. and Jimenez A. (1986) Nucl. Acids 40 Res. 14, 4617-4624.
- Weich H. A., Sebald W., Schairer H. U., and Hoppe J. (1986), FEBS Lett. 198, 344-348.
- 45 Wigler M., Sweet R., Sim G. K., Wold B., Pellicer A., Lacy E., Maniatis T., Silverstein S., and Axel R. (1979) Cell 16, 777-785.
- Wirth M., Bode J., Zettlmeißl G., and Hauser H. (1988) Gene 73, 50 419-426.
- Wirth M., Schumacher L., and Hauser H. (1991) In Modern Approaches to Animal Cell Technology, Griffiths B., Spier R., and Meigner R., eds. Butterworths), pp. 338-343.

- 43 -

Wise R. J., Orkin S. H. and Collins T. (1989) Nucl. Acids Res. 17, 6591-6601.

Wood C. R., Morris G. E., Alderman E. M., Fouser L., and Kaufman R. J. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8006-8010.

Young R. M., Mendoza A. E., Collins T. and Orkin S. H. (1990) Mol. Cell. Biol. 10, 6051-6054.

44  
SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Beiersdorf AG
- (B) STRASSE: Unnastr. 48
- (C) ORT: Hamburg
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 20245

- (A) NAME: GBF - Gesellschaft fuer Biotechnologische Forschung mbH
- (B) STRASSE: Mascheroder Weg 1
- (C) ORT: Braunschweig
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 38124

(ii) ANMELDETITEL: Multicistronische Expressionseinheiten und deren Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 25

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 748 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

## (vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

## (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pODA (Eichner et al., 1989)

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 95..682
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "PDGF-A Vorlaeufersequenz (kurze Spliceform)"  
/note= "humane PDGF-A Gen (kurze Spliceform, [2]) aus pODA, flankiert von 5'-EcoRI und 3'-HindIII Restriktionschnittstellen"  
/citation= ([2])

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat\_peptide
- (B) LAGE: 353..682
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "mature PDGF-A Kette"

45

## (x) VERÖFFENTLICHUNGSGEDECKTEN INFORMATION:

(A) AUTOREN: Eichner, W.  
 Jaeger, V.  
 Herbst, D.  
 Hauser, H.  
 Hoppe, J.

(C) ZEITSCHRIFT: Eur. J. Biochem.  
 (D) BAND: 185  
 (F) SEITEN: 135-140  
 (G) DATUM: 1989

## (x) VERÖFFENTLICHUNGSGEDECKTEN INFORMATION:

(A) AUTOREN: Hoppe, J.  
 Schumacher, L.  
 Eichner, W.  
 Weich, H. A.

(C) ZEITSCHRIFT: FEBS Lett.  
 (D) BAND: 223  
 (F) SEITEN: 243-246  
 (G) DATUM: 1987

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAATTCCAC TGAATTCGC CGCCACAGGA GACCGGCTGG AGCGCCGCC CCGCGCCTCG	60
CCTCTCCTCC GAGCAGCCAG CGCCTCGGGA CGCG ATG AGG ACC TTG GCT TGC Met Arg Thr Leu Ala Cys -86 -85	112
CTG CTG CTC CTC GGC TGC GGA TAC CTC GCC CAT GTT CTG GCC GAG GAA Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala His Val Leu Ala Glu Glu -80 -75 -70 -65	160
GCC GAG ATC CCC CGC GAG GTG ATC GAG AGG CTG GCC CGC AGT CAG ATC Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg Leu Ala Arg Ser Gln Ile -60 -55 -50	208
CAC AGC ATC CGG GAC CTC CAG CGA CTC CTG GAG ATA GAC TCC GTA GGG His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu Glu Ile Asp Ser Val Gly -45 -40 -35	256
AGT GAG GAT TCT TTG GAC ACC AGC CTG AGA GCT CAC GGG GTC CAC GCC Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg Ala His Gly Val His Ala -30 -25 -20	304
ACT AAG CAT GTG CCC GAG AAG CGG CCC CTG CCC ATT CGG AGG AAG AGA Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu Pro Ile Arg Arg Lys Arg -15 -10 -5	352
AGC ATC GAG GAA GCT GTC CCC GCT GTC TGC AAG ACC AGG ACG GTC ATT Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys Lys Thr Arg Thr Val Ile 1 5 10 15	400
TAC GAG ATT CCT CGG AGT CAG GTC GAC CCC ACG TCC GCC AAC TTC CTG Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro Thr Ser Ala Asn Phe Leu 20 25 30	448
ATC TGG CCC CCG TGC GTG GAG GTG AAA CGC TGC ACC GGC TGC TGC AAC Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg Cys Thr Gly Cys Cys Asn 35 40 45	496
ACG AGC AGT GTC AAG TGC CAG CCC TCC CGC GTC CAC CAC CGC AGC GTC Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg Val His His Arg Ser Val 50 55 60	544

46

AAG GTG GCC AAG GTG GAA TAC GTC AGG AAG CCA AAA TTA AAA GAA Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys Lys Pro Lys Leu Lys Glu 65                   70                   75                   80	592
GTC CAG GTG AGG TTA GAG GAG CAT TTG GAG TGC GCC TGC GCG ACC ACA Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu Cys Ala Cys Ala Thr Thr 85                   90                   95	640
AGC CTG AAT CCG GAT TAT CGG GAA GAG GAC ACG GAT GTG AGG Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp Thr Asp Val Arg 100               105               110	682
TGAGGATGAG CCCCAGCCCT TTCCTGGGAC ATGGATGTGG GGATCCGTCG ACCTGCAGCC AAGCTT	742
	748

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 196 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala -86 -85                   -80                   -75
His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg -70                   -65                   -60                   -55
Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu -50                   -45                   -40
Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg -35                   -30                   -25
Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu -20                   -15                   -10
Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys -5                   1                   5                   10
Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro 15                   20                   25
Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg 30                   35                   40
Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg 45                   50                   55
Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys 60                   65                   70
Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu 75                   80                   85                   90

- 47 -

Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp  
           95                   100                   105

Thr Asp Val Arg  
110

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 868 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:  
(B) CLON: pMVW-2 (Weich et al., 1986)

(ix) MERKMALE:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
(B) LAGE: 40..762  
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "PDGF-B  
Vorlaeufersequenz"  
/note= "humanes PDGF-B Gen aus pGEM2-PDGF-B,  
flankiert von 5'-EcoRI und 3'-HindIII  
Restriktionsschnittstellen"

(ix) MERKMALE:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat\_peptide  
(B) LAGE: 283..609  
(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "mature PDGF-B Kette"

(x) VERÖFFENTLICHUNGSDATEN:  
(A) AUTOREN: Weich, H. A.  
Sebald, W.  
Schairer, H. U.  
Hoppe, U.  
(C) ZEITSCHRIFT: FEBS Lett.  
(D) BAND: 198  
(F) SEITEN: 344-348  
(G) DATUM: 1986

GAATTCTGAGC TCGCCGGGG ATCCTCTAGA GTCGACACC ATG AAT CGC TGC TGG Met Asn Arg Cys Trp -81 -80	54
GCG CTC TTC CTG TCT CTC TGC TGC TAC CTG CGT CTG GTC AGC GCC GAG Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg Leu Val Ser Ala Glu -75 -70 -65	102
GGG GAC CCC ATT CCC GAG GAG CTT TAT GAG ATG CTG AGT GAT CAC TCG Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met Leu Ser Asp His Ser -60 -55 -50 -45	150

48

ATC CGC TCC TTT GAT GAT CTC CAA CGC CTG CTG CAC GGA GAC CCC GGA Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu His Gly Asp Pro Gly -40 -35 -30	198
GAG GAA GAT GGG GCC GAG TTG GAC CTG AAC ATG ACC CGC TCC CAC TCT Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met Thr Arg Ser His Ser -25 -20 -15	246
GGA GGC GAG CTG GAG AGC TTG GCT CGT GGA AGA AGG AGC CTG GGT TCC Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg Arg Ser Leu Gly Ser -10 -5 1	294
CTG ACC ATT GCT GAG CCG GCC ATG ATC GCC GAG TGC AAG ACG CGC ACC Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu Cys Lys Thr Arg Thr 5 10 15 20	342
GAG GTG TTC GAG ATC TCC CGG CGC CTC ATA GAC CGC ACC AAC GCC AAC Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp Arg Thr Asn Ala Asn 25 30 35	390
TTC CTG GTG TGG CCG CCC TGT GTG GAG GTG CAG CGC TGC TCC GGC TGC Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln Arg Cys Ser Gly Cys 40 45 50	438
TGC AAC AAC CGC AAC GTG CAG TGC CGC CCC ACC CAG GTG CAG CTG CGA Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr Gln Val Gln Leu Arg 55 60 65	486
CCT GTC CAG GTG AGA AAG ATC GAG ATT GTG CGG AAG AAG CCA ATC TTT Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro Ile Phe 70 75 80	534
AAG AAG GCC ACG GTG ACG CTG GAA GAC CAC CTG GCA TGC AAG TGT GAG Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu Ala Cys Lys Cys Glu 85 90 95 100	582
ACA GTG GCA GCT GCA CGG CCT GTG ACC CGA AGC CCG GGG GGT TCC CAG Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser Pro Gly Gly Ser Gln 105 110 115	630
GAG CAG CGA GCC AAA ACG CCC CAA ACT CGG GTG ACC ATT CGG ACG GTG Glu Gln Arg Ala Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val Thr Ile Arg Thr Val 120 125 130	678
CGA GTC CGC CGG CCC CCC AAG GGC AAG CAC CGG AAA TTC AAG CAC ACG Arg Val Arg Arg Pro Pro Lys Gly Lys His Arg Lys Phe Lys His Thr 135 140 145	726
CAT GAC AAG ACG GCA CTG AAG GAG ACC CTT GGA GCC TAGGGGCATC His Asp Lys Thr Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly Ala 150 155 160	772
GGCAGGAGAG TGTGTGGGCA GGGTTATTAA ATATGGTATT TGCTGTATTG CCCCCATGGC	832
CCAATCGATC CCGTCGACCT GCAGGCATGC AAGCTT	868

49

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 241 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg  
 -81 -80 -75 -70

Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met  
 -65                    -60                    -55                    -50

Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu  
-45 -40 -35

His Gly Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met  
-30 -25 -20

Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg  
-15 -10 -5

Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu  
1 5 10 15

Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp  
20 25 30

Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln  
35 40 45

Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr  
50 55 60

Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg  
65 70 75

Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu  
80 85 90 95

Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Ser  
100 105 110

Pro Gly Gly Ser Gln Glu Gln Arg Ala Lys Thr Pro Gln Thr Arg Val  
115 120 125

Thr Ile Arg Thr Val Arg Val Arg Arg Pro Pro Lys Gly Lys His Arg  
130 135 140

Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Thr Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly  
145 150 155

Ala  
160

50

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 628 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzel
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Poliovirus Typ 1 (Mahoney strain)
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
  - (B) CLON: pGEM3-5'Polio (M) (4708 bp), (Sarnow, 1989)
- (ix) MERKMALE:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
  - (B) LAGE: 1..628
  - (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "abgebildet sind die ersten 628 nt der 5' nicht-translatierten Region des Poliovirus Typ 1 (Mahoney)"
- (ix) MERKMALE:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
  - (B) LAGE: 610
  - (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "nicht-authentische Sequenz auf Grund einer Basenpaarsubstitution von C nach G an der Position 610"
- (x) VERÖFFENTLICHUNGSDATEN:
  - (A) AUTOREN: Sarnow, P.
  - (C) ZEITSCHRIFT: J. Virol.
  - (D) BAND: 63
  - (F) SEITEN: 467-470
  - (G) DATUM: 1989

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TTAAAACAGC TCTGGGGTTG TACCCACCCC AGAGGCCAC GTGGCGGCTA GTACTCCGGT	60
ATTGCAGTAC CCTTGTACGC CTGTTTATA CTCCCTTCCC GTAACCTAGA CGCACAAAC	120
CAAGTTCAAT AGAAGGGGGT ACAAACCAAGT ACCACCACGA ACAAGCACTT CTGTTTCCCC	180
GGTGATGTCG TATAGACTGC TTGCGTGGTT GAAAGCGACG GATCCGTTAT CCGCTTATGT	240
ACTTCGAGAA GCCCAGTACC ACCTCGGAAT CTTGATGCG TTGCGCTCAG CACTCAACCC	300
CAGAGTGTAG CTTAGGCTGA TGAGTCTGGA CATCCCTCAC CGGTGACGGT GGTCCAGGCT	360
GCGTTGGCGG CCTACCTATG GCTAACGCCA TGGGACGCTA GTTGTGAACA AGGTGTGAAG	420
AGCCTATTGA GCTACATAAG AATCCCTCCGG CCCCTGAATG CGGCTAATCC CAACCTCGGA	480
GCAGGGTGGTC ACAAACCAAGT GATTGGCCTG TCGTAACGCG CAAGTCCGTG GCGGAACCGA	540
CTACTTTGGG TGTCCGTGTT TCCTTTATT TTATTGTGGC TGCTTATGGT GACAATCACA	600
GATTGTTATG ATAAAGCGAA TTGGATTG	628

51

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 55 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Xenopus laevis (Falcone & Andrews; Patient et al.)

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LAGE: 12..55
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "beta-Globin Homologie;  
partielle Sequenz, flankiert v.  
Restriktionsschnittstellen."

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LAGE: 12..55
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "Die 5'-3'-Orientierung gilt  
f. Insertion zwischen Polio-UTR und Cistron 2 der  
bicistronischen Vektoren"

## (x) VERÖFFENTLICHUNGSDATEN:

- (A) AUTOREN: Falcone, D.  
Andrews, D. W.
- (C) ZEITSCHRIFT: Mol. Cell. Biol.
- (D) BAND: 11
- (E) AUSGABE: 5
- (F) SEITEN: 2656-2664
- (G) DATUM: 1991

## (x) VERÖFFENTLICHUNGSDATEN:

- (A) AUTOREN: Patient, R. K.  
Harris, R.  
Walmsley, M. E.  
Williams, J. G.
- (C) ZEITSCHRIFT: J. Biol. Chem.
- (D) BAND: 258
- (F) SEITEN: 8521-8523
- (G) DATUM: 1983

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GGCCGTGAC GCTTGTCTT TTTGCAGAAG CTCAGAATAA ACGCTCAACT TTGGC

52

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LAGE: 1..17
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= M1317MER  
/note= "synthetische DNA; M13 Sequenzierprimer  
(New England Biolabs GmbH), eingesetzt fuer PCR"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GTAAAAACGAC GGCCAGT

17

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LAGE: 1..24
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= M1324MER  
/note= "synthetische DNA; M13 reverser  
Sequenzierprimer (New England Biolabs GmbH),  
eingesetzt fuer PCR"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

AGCGGATAAC AATTCACAC AGGA

24

53

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

- (ix) MERKMALE:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: -  
(B) LAGE: 1..19  
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= NCCLSA1  
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker zur  
Umklonierung des verkürzten PDGF-B Vorlaeufers  
aus pMVW-2 in den Bakteriophagen M13mp19"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CATGGCCCAA TCGATCCCG

19

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

- (ix) MERKMALE:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: -  
(B) LAGE: 1..19  
(D) SONSTIGE ANGABEN: /label= NCCLSA2  
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker zur  
Umklonierung des verkürzten PDGF-B Vorlaeufers  
aus pMVW-2 in den Bakteriophagen M13mp19"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

TCGACGGGAT CGATTGGGC

19

54

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzel
  - (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LAGE: 1..37
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= PDGBBCL  
*/note= "synthetische DNA; Mutagenesepimer zur Einfuehrung einer BclI-Schnittstelle in den 5'-Bereich des PDGF-B Vorlaeufers"*

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GCTTTATGAG ATGCTGAGTG ATCACTCGAT CCGCTCC

37

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 110 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzel
  - (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LAGE: 1..110
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= PPDGFB1  
*/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker zur Rekonstitution der maturen PDGF-B Vorlaeufersequenz"*

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

TCGACACCAT GAATCGCTGC TGGCGCTCT TCCTGTCTCT CTGCTGCTAC CTGCGTCTGG

60

TCAGCGCCGA GGGGGACCCC ATTCCCGAGG AGCTTTATGA GATGCTGAGT

110

55

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 13:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 110 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LAGE: 1..110
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= PPDGFB2  
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker zur  
Rekonstitution der maturen PDGF-B  
Vorlaeufersequenz"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

GATCACTCAG CATCTCATAA AGCTCCTCGG GAATGGGGTC CCCCTCGGCG CTGACCAGAC	60
GCAGGGTAGCA GCAGAGAGAC AGGAAGAGCG CCCAGCAGCG ATTCAATGGTG	110

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 14:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LAGE: 1..30
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= 5'-POLIO1  
/note= "synthetische DNA; synthetischer  
PCR-Primer"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

TTTCTGCAGA AGCTTAAAAC AGCTCTGGGG	30
----------------------------------	----

56

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 15:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LAGE: 1..28
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= 3'-POLIO2  
/note= "synthetische DNA; synthetischer  
PCR-Primer"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

TTGCGGGCCGC AATCCAATTG GCTTTATC

28

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 16:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LAGE: 1..13
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= E-N-E1  
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

AATTGCGGCC GCG

13

57

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 17:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 13 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LAGE: 1..13
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= E-N-E2  
/note= "synthetische DNA; synthetischer Linker"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

AATTCGCGGC CGC

13

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 18:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LAGE: 1..16
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= PDGFB190-PRIMI  
/note= "synthetische DNA; synthetischer  
PCR-Primer"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

GAATTCGAGC TCGCCCGGG

19

58

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 19:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: -
- (B) LAGE: 1..37
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /label= PDGFB190-PRIMII  
/note= "synthetische DNA; synthetischer  
PCR-Primer"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

CCCGGGAAAGC TTCCGGTTAT CAGGTCACAG CCCGTGC

37

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 20:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1956 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

## (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON: pSQ2-SEAP (Berger et al., 1988)

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 43..1560
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "humanes SEAP-Gen; flankiert  
von 5'-EcoRI und 3'-HindIII  
Restriktionsschnittstellen"

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat\_peptide
- (B) LAGE: 94..1560
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "matures Protein"

## (x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:

- (A) AUTOREN: Berger, J.  
Hauber, J.  
Hauber, R.  
Geiger, R.  
Cullen, B. R.

- (C) ZEITSCHRIFT: Gene

- (D) BAND: 66

- (F) SEITEN: 1-10

- (G) DATUM: 1988

## (x) VERÖFFENTLICHUNGSGEDECKTE INFORMATION:

(A) AUTOREN: Millan, J. L.  
 (C) ZEITSCHRIFT: J. Biol. Chem.  
 (D) BAND: 261  
 (F) SEITEN: 3112-3115  
 (G) DATUM: 1986

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

GAATTCCAGC TCGCCCGGGG ATCCTCTAGA GTCAGCTTCT GC ATG CTG CTG CTG	54
Met Leu Leu Leu	
-17 -15	
CTG CTG CTG CTG GGC CTG AGG CTA CAG CTC TCC CTG GGC ATC ATC CCA	102
Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu Gly Ile Ile Pro	
-10 -5 1	
GTT GAG GAG GAG AAC CCG GAC TTC TGG AAC CGC GAG GCA GCC GAG GCC	150
Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn Arg Glu Ala Ala Glu Ala	
5 10 15	
CTG GGT GCC GCC AAG AAG CTG CAG CCT GCA CAG ACA GCC GCC AAG AAC	198
Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala Gln Thr Ala Ala Lys Asn	
20 25 30 35	
CTC ATC ATC TTC CTG GGC GAT GGG ATG GGG GTG TCT ACG GTG ACA GCT	246
Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser Thr Val Thr Ala	
40 45 50	
GCC AGG ATC CTA AAA GGG CAG AAG AAG GAC AAA CTG GGG CCT GAG ATA	294
Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp Lys Leu Gly Pro Glu Ile	
55 60 65	
CCC CTG GCC ATG GAC CGC TTC CCA TAT GTG GCT CTG TCC AAG ACA TAC	342
Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val Ala Leu Ser Lys Thr Tyr	
70 75 80	
AAT GTA GAC AAA CAT GTG CCA GAC AGT GGA GCC ACA GCC ACG GCC TAC	390
Asn Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly Ala Thr Ala Thr Ala Tyr	
85 90 95	
CTG TGC GGG GTC AAG GGC AAC TTC CAG ACC ATT GGC TTG AGT GCA GCC	438
Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr Ile Gly Leu Ser Ala Ala	
100 105 110 115	
GCC CGC TTT AAC CAG TGC AAC ACG ACA CGC GGC AAC GAG GTC ATC TCC	486
Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn Glu Val Ile Ser	
120 125 130	
GTG ATG AAT CGG GCC AAG AAA GCA GGG AAG TCA GTG GGA GTG GTA ACC	534
Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val Gly Val Val Thr	
135 140 145	
ACC ACA CGA GTG CAG CAC GCC TCG CCA GCC GGC ACC TAC GCC CAC ACG	582
Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Thr Tyr Ala His Thr	
150 155 160	
GTG AAC CGC AAC TGG TAC TCG GAC GCC GAC GTG CCT GCC TCG GCC CGC	630
Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Val Pro Ala Ser Ala Arg	
165 170 175	
CAG GAG GGG TGC CAG GAC ATC GCT ACG CAG CTC ATC TCC AAC ATG GAC	678
Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Ile Ser Asn Met Asp	
180 185 190 195	

60

ATT GAC GTG ATC CTA GGT GGA GGC CGA AAG TAC ATG TTT CCC ATG GGA Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Arg Lys Tyr Met Phe Pro Met Gly 200 205 210	726
ACC CCA GAC CCT GAG TAC CCA GAT GAC TAC AGC CAA GGT GGG ACC AGG Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr Ser Gln Gly Gly Thr Arg 215 220 225	774
CTG GAC GGG AAG AAT CTG GTG CAG GAA TGG CTG GCG AAG CGC CAG GGT Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp Leu Ala Lys Arg Gln Gly 230 235 240	822
GCC CGG TAT GTG TGG AAC CGC ACT GAG CTC ATG CAG GCT TCC CTG GAC Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Met Gln Ala Ser Leu Asp 245 250 255	870
CCG TCT GTG ACC CAT CTC ATG GGT CTC TTT GAG CCT GGA GAC ATG AAA Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro Gly Asp Met Lys 260 265 270 275	918
TAC GAG ATC CAC CGA GAC TCC ACA CTG GAC CCC TCC CTG ATG GAG ATG Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp Pro Ser Leu Met Glu Met 280 285 290	966
ACA GAG GCT GCC CTG CGC CTG CTG AGC AGG AAC CCC CGC GGC TTC TTC Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg Asn Pro Arg Gly Phe Phe 295 300 305	1014
CTC TTC GTG GAG GGT GGT CGC ATC GAC CAT GGT CAT CAT GAA AGC AGG Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His Gly His His Glu Ser Arg 310 315 320	1062
GCT TAC CGG GCA CTG ACT GAG ACG ATC ATG TTC GAC GAC GCC ATT GAG Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met Phe Asp Asp Ala Ile Glu 325 330 335	1110
AGG GCG GGC CAG CTC ACC AGC GAG GAG GAC ACG CTG AGC CTC GTC ACT Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp Thr Leu Ser Leu Val Thr 340 345 350 355	1158
GCC GAC CAC TCC CAC GTC TTC TCC TTC GGA GGC TAC CCC CTG CGA GGG Ala Asp His Ser Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr Pro Leu Arg Gly 360 365 370	1206
AGC TCC ATC TTC GGG CTG GCC CCT GGC AAG GCC CGG GAC AGG AAG GCC Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg Asp Arg Lys Ala 375 380 385	1254
TAC ACG GTC CTC CTA TAC GGA AAC GGT CCA GGC TAT GTG CTC AAG GAC Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Val Leu Lys Asp 390 395 400	1302
GGC GCC CGG CCG GAT GTT ACC GAG AGC GAG AGC GGG AGC CCC GAG TAT Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly Ser Pro Glu Tyr 405 410 415	1350
CGG CAG CAG TCA GCA GTG CCC CTG GAC GAA GAG ACC CAC GCA GGC GAG Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr His Ala Gly Glu 420 425 430 435	1398
GAC GTG GCG GTG TTC GCG CGC GGC CCG CAG GCG CAC CTG GTT CAC GGC Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu Val His Gly 440 445 450	1446

61

GTG CAG GAG CAG ACC TTC ATA GCG CAC GTC ATG GCC TTC GCC GCC TGC Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala Phe Ala Ala Cys 455 460 465	1494
CTG GAG CCC TAC ACC GCC TGC GAC CTG GCG CCC CCC GCC GGC ACC ACC Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro Pro Ala Gly Thr Thr 470 475 480	1542
GAC GCC GCG CAC CCG GGT TAACCCGTGG TCCCCGCGTT GCTTCCTCTG Asp Ala Ala His Pro Gly 485	1590
CTGGCCGGGA CCCTGCTGCT GCTGGAGACG GCCACTGCTC CCTGAGTGTC CCGTCCCTGG GGCTCCTGCT TCCCCATCCC GGAGTTCTCC TGCTCCCCAC CTCCTGTCGT CCTGCCTGGC CTCCAGCCCC AGTCGTCATC CCCGGAGTCC CTATACAGAG GTCCCTGCCAT GGAACCTTCC CCTCCCCGTG CGCTCTGGGG ACTGAGCCCA TGACACCAAA CCTGCCCCTT GGCTGCTCTC GGACTCCCTA CCCCAACCCC AGGGACTGCA GGTTGTGCCC TGTGGCTGCC TGCAACCCAG GAAAGGAGGG GGCTCAGGCC ATCCAGCCAC CACCTACAGC CCAGTGGCCT CGAGCTGCAG AAGCTT	1650 1710 1770 1830 1890 1950 1956

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 21:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 506 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Arg Leu Gln Leu Ser Leu -17 -15 -10 -5
Gly Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn Arg Glu 1 5 10 15
Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala Gln Thr 20 25 30
Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly Val Ser 35 40 45
Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp Lys Leu 50 55 60
Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val Ala Leu 65 70 75
Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly Ala Thr 80 85 90 95
Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr Ile Gly 100 105 110

62

Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg Gly Asn  
 115 120 125  
 Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys Ser Val  
 130 135 140  
 Gly Val Val Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala Gly Thr  
 145 150 155  
 Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp Val Pro  
 160 165 170 175  
 Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln Leu Ile  
 180 185 190  
 Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Arg Lys Tyr Met  
 195 200 205  
 Phe Pro Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr Ser Gln  
 210 215 220  
 Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp Leu Ala  
 225 230 235  
 Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu Met Gln  
 240 245 250 255  
 Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe Glu Pro  
 260 265 270  
 Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp Pro Ser  
 275 280 285  
 Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg Asn Pro  
 290 295 300  
 Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Arg Ile Asp His Gly His  
 305 310 315  
 His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met Phe Asp  
 320 325 330 335  
 Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp Thr Leu  
 340 345 350  
 Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly Gly Tyr  
 355 360 365  
 Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg  
 370 375 380  
 Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr  
 385 390 395  
 Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly  
 400 405 410 415  
 Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr  
 420 425 430  
 His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His  
 435 440 445

63

Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala  
 450 455 460

Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro Pro  
 465 470 475

Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly  
 480 485

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 22:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 1811 Basenpaare  
 (B) ART: Nukleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
 (A) ORGANISMUS: Feuerfliege (*Photinus pyralis*)

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:  
 (B) CLON: pRSVLUC (de Wet et al., 1987)

(ix) MERKMALE:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
 (B) LAGE: 94..1743  
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /note= "codierende Region des Luciferase-Gens; flankiert von 5'-SmaI und 3'-HindIII Restriktionsschnittstellen"

## (x) VERÖFFENTLICHUNGSDATEN:

- (A) AUTOREN: de Wet, J. R.  
 Wood, K. V.  
 DeLuca, M.  
 Helinski, D. R.  
 Subramani, S.
- (C) ZEITSCHRIFT: Mol. Cell. Biol.  
 (D) BAND: 7  
 (F) SEITEN: 725-737  
 (G) DATUM: 1987

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

CCCGGGGATC CTCTAGAGTC AGCTTGAATT CCTTTGTGTT ACATTCTTGA ATGTCGCTCG	60
CAGTGACATT AGCATTCCGG TACTGTTGGT AAA ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile 1                 5	114
AAG AAA GGC CCG GCG CCA TTC TAT CCT CTA GAG GAT GGA ACC GCT GGA Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly 10                 15                 20	162

64

GAG CAA CTG CAT AAG GCT ATG AAG AGA TAC GCC CTG GTT CCT GGA ACA Glu Gln Leu His Lys Ala Met Lys Arg Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr 25 30 35	210
ATT GCT TTT ACA GAT GCA CAT ATC GAG GTG AAC ATC ACG TAC GCG GAA Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu Val Asn Ile Thr Tyr Ala Glu 40 45 50 55	258
TAC TTC GAA ATG TCC CGG TTG GCA GAA GCT ATG AAA CGA TAT GGG Tyr Phe Glu Met Ser Val Arg Leu Ala Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly 60 65 70	306
CTG AAT ACA AAT CAC AGA ATC GTC GTA TGC AGT GAA AAC TCT CTT CAA Leu Asn Thr Asn His Arg Ile Val Val Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln 75 80 85	354
TTC TTT ATG CCG GTG TTG GGC GCG TTA TTT ATC GGA GTT GCA GTT GCG Phe Phe Met Pro Val Leu Gly Ala Leu Phe Ile Gly Val Ala Val Ala 90 95 100	402
CCC GCG AAC GAC ATT TAT AAT GAA CGT GAA TTG CTC AAC AGT ATG AAC Pro Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg Glu Leu Leu Asn Ser Met Asn 105 110 115	450
ATT TCG CAG CCT ACC GTA GTG TTT GTT TCC AAA AAG GGG TTG CAA AAA Ile Ser Gln Pro Thr Val Val Phe Val Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys 120 125 130 135	498
ATT TTG AAC GTG CAA AAA AAA TTA CCA ATA ATC CAG AAA ATT ATT ATC Ile Leu Asn Val Gln Lys Lys Leu Pro Ile Ile Gln Lys Ile Ile Ile 140 145 150	546
ATG GAT TCT AAA ACG GAT TAC CAG GGA TTT CAG TCG ATG TAC ACG TTC Met Asp Ser Lys Thr Asp Tyr Gln Gly Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe 155 160 165	594
GTC ACA TCT CAT CTA CCT CCC GGT TTT AAT GAA TAC GAT TTT GTA CCA Val Thr Ser His Leu Pro Pro Gly Phe Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro 170 175 180	642
GAG TCC TTT GAT CGT GAC AAA ACA ATT GCA CTG ATA ATG AAT TCC TCT Glu Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr Ile Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser 185 190 195	690
GGA TCT ACT GGG TTA CCT AAG GGT GTG GCC CTT CCG CAT AGA ACT GCC Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Ala Leu Pro His Arg Thr Ala 200 205 210 215	738
TGC GTC AGA TTC TCG CAT GCC AGA GAT CCT ATT TTT GGC AAT CAA ATC Cys Val Arg Phe Ser His Ala Arg Asp Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile 220 225 230	786
ATT CCG GAT ACT GCG ATT TTA AGT GTT GTT CCA TTC CAT CAC GGT TTT Ile Pro Asp Thr Ala Ile Leu Ser Val Val Pro Phe His His Gly Phe 235 240 245	834
GGA ATG TTT ACT ACA CTC GGA TAT TTG ATA TGT GGA TTT CGA GTC GTC Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu Ile Cys Gly Phe Arg Val Val 250 255 260	882
TTA ATG TAT AGA TTT GAA GAA GAG CTG TTT TTA CGA TCC CTT CAG GAT Leu Met Tyr Arg Phe Glu Glu Leu Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp 265 270 275	930

65

TAC AAA ATT CAA AGT GCG TTG CTA GTA CCA ACC CTA TTT TCA TTC TTC Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu Val Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe 280 285 290 295	978
GCC AAA AGC ACT CTG ATT GAC AAA TAC GAT TTA TCT AAT TTA CAC GAA Ala Lys Ser Thr Leu Ile Asp Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu His Glu 300 305 310	1026
ATT GCT TCT GGG GGC GCA CCT CTT TCG AAA GAA GTC GGG GAA GCG GTT Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys Glu Val Gly Glu Ala Val 315 320 325	1074
GCA AAA CGC TTC CAT CTT CCA GGG ATA CGA CAA GGA TAT GGG CTC ACT Ala Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr 330 335 340	1122
GAG ACT ACA TCA GCT ATT CTG ATT ACA CCC GAG GGG GAT GAT AAA CCG Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro 345 350 355	1170
GGC GCG GTC GGT AAA GTT GTT CCA TTT TTT GAA GCG AAG GTT GTG GAT Gly Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe Phe Glu Ala Lys Val Val Asp 360 365 370 375	1218
CTG GAT ACC GGG AAA ACG CTG GGC GTT AAT CAG AGA GGC GAA TTA TGT Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys 380 385 390	1266
GTC AGA GGA CCT ATG ATT ATG TCC GGT TAT GTA AAC AAT CCG GAA GCG Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala 395 400 405	1314
ACC AAC GCC TTG ATT GAC AAG GAT GGA TGG CTA CAT TCT GGA GAC ATA Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly Trp Leu His Ser Gly Asp Ile 410 415 420	1362
GCT TAC TGG GAC GAA GAC GAA CAC TTC TTC ATA GTT GAC CGC TTG AAG Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys 425 430 435	1410
TCT TTA ATT AAA TAC AAA GGA TAT CAG GTG GCC CCC GCT GAA TTG GAA Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu 440 445 450 455	1458
TCG ATA TTG TTA CAA CAC CCC AAC ATC TTC GAC GCG GGC GTG GCA GGT Ser Ile Leu Leu Gln Pro Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly 460 465 470	1506
CTT CCC GAC GAT GAC GCC GGT GAA CTT CCC GCC GCC GTT GTT GTT TTG Leu Pro Asp Asp Asp Ala Gly Glu Leu Pro Ala Ala Val Val Val Leu 475 480 485	1554
GAG CAC GGA AAG ACG ATG ACG GAA AAA GAG ATC GTG GAT TAC GTC GCC Glu His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala 490 495 500	1602
AGT CAA GTA ACA ACC GCG AAA AAG TTG CGC GGA GGA GTT GTG TTT GTG Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu Arg Gly Gly Val Val Phe Val 505 510 515	1650
GAC GAA GTA CCG AAA GGT CTT ACC GGA AAA CTC GAC GCA AGA AAA ATC Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile 520 525 530 535	1698

66

AGA GAG ATC CTC ATA AAG GCC AAG AAG GGC GGA AAG TCC AAA TTG	1743
Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys Gly Gly Lys Ser Lys Leu	
540 545 550	
TAAAATGTAA CTGTATTCAG CGATGACGAA ATTCTTAGCT ATTGTAATAG CTGCAGGCAT	1803
GCAAGCTT	1811

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 23:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 550 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: Linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro	
1 5 10 15	
Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Lys Ala Met Lys Arg	
20 25 30	
Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu	
35 40 45	
Val Asn Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr Phe Glu Met Ser Val Arg Leu Ala	
50 55 60	
Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu Asn Thr Asn His Arg Ile Val Val	
65 70 75 80	
Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Met Pro Val Leu Gly Ala Leu	
85 90 95	
Phe Ile Gly Val Ala Val Ala Pro Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg	
100 105 110	
Glu Leu Leu Asn Ser Met Asn Ile Ser Gln Pro Thr Val Val Phe Val	
115 120 125	
Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys Ile Leu Asn Val Gln Lys Lys Leu Pro	
130 135 140	
Ile Ile Gln Lys Ile Ile Met Asp Ser Lys Thr Asp Tyr Gln Gly	
145 150 155 160	
Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe Val Thr Ser His Leu Pro Pro Gly Phe	
165 170 175	
Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr Ile	
180 185 190	
Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val	
195 200 205	
Ala Leu Pro His Arg Thr Ala Cys Val Arg Phe Ser His Ala Arg Asp	
210 215 220	

67

Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile Ile Pro Asp Thr Ala Ile Leu Ser Val  
225 230 235 240

Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu  
245 250 255

Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met Tyr Arg Phe Glu Glu Leu  
260 265 270

Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu Val  
275 280 285

Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr Leu Ile Asp Lys Tyr  
290 295 300

Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser  
305 310 315 320

Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile  
325 330 335

Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr  
340 345 350

Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe  
355 360 365

Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val  
370 375 380

Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly  
385 390 395 400

Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly  
405 410 415

Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe  
420 425 430

Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln  
435 440 445

Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile  
450 455 460

Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Asp Ala Gly Glu Leu  
465 470 475 480

Pro Ala Ala Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys  
485 490 495

Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu  
500 505 510

Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly  
515 520 525

Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys  
530 535 540

Gly Gly Lys Ser Lys Leu  
545 550

68

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 24:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 625 Basenpaare  
 (B) ART: Nukleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
 (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:  
 (B) CLON: pSBC-1/-2-PDGF-B

(ix) MERKMALE:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
 (B) LAGE: 40..609  
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "PDGF-B  
 Vorlaeufersequenz"

(ix) MERKMALE:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat\_peptide  
 (B) LAGE: 283..609  
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "mature PDGF-B Kette"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

GAATTCGAGC TCGCCGGGG ATCCTCTAGA GTCGACACC ATG AAT CGC TGC TGG Met Asn Arg Cys Trp -81 -80	54
GCG CTC TTC CTG TCT CTC TGC TGC TAC CTG CGT CTG GTC AGC GCC GAG Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg Leu Val Ser Ala Glu -75 -70 -65	102
GGG GAC CCC ATT CCC GAG GAG CTT TAT GAG ATG CTG AGT GAT CAC TCG Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met Leu Ser Asp His Ser -60 -55 -50 -45	150
ATC CGC TCC TTT GAT GAT CTC CAA CGC CTG CTG CAC GGA GAC CCC GGA Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu His Gly Asp Pro Gly -40 -35 -30	198
GAG GAA GAT GGG GCC GAG TTG GAC CTG AAC ATG ACC CGC TCC CAC TCT Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met Thr Arg Ser His Ser -25 -20 -15	246
GGA GGC GAG CTG GAG AGC TTG GCT CGT GGA AGA AGG AGC CTG GGT TCC Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg Arg Ser Leu Gly Ser -10 -5 1	294
CTG ACC ATT GCT GAG CCG GCC ATG ATC GCC GAG TGC AAG ACG CGC ACC Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu Cys Lys Thr Arg Thr 5 10 15 20	342
GAG GTG TTC GAG ATC TCC CGG CGC CTC ATA GAC CGC ACC AAC GCC AAC Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp Arg Thr Asn Ala Asn 25 30 35	390

63

TTC CTG GTG TGG CCG CCC TGT GTG GAG GTG CAG CGC TGC TCC GGC TGC Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln Arg Cys Ser Gly Cys 40 45 50	438
TGC AAC AAC CGC AAC GTG CAG TGC CGC CCC ACC CAG GTG CAG CTG CGA Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr Gln Val Gln Leu Arg 55 60 65	486
CCT GTC CAG GTG AGA AAG ATC GAG ATT GTG CGG AAG AAG CCA ATC TTT Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg Lys Lys Pro Ile Phe 70 75 80	534
AAG AAG GCC ACG GTG ACG CTG GAA GAC CAC CTG GCA TGC AAG TGT GAG Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu Ala Cys Lys Cys Glu 85 90 95 100	582
ACA GTG GCA GCT GCA CGG CCT GTG ACC TGATAACCGG AACGTT Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr 105	625

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 25:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 190 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg -81 -80 -75 -70
Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met -65 -60 -55 -50
Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu -45 -40 -35
His Gly Asp Pro Gly Glu Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met -30 -25 -20
Thr Arg Ser His Ser Gly Gly Glu Leu Glu Ser Leu Ala Arg Gly Arg -15 -10 -5
Arg Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu 1 5 10 15
Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp 20 25 30
Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln 35 40 45
Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr 50 55 60
Gln Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg 65 70 75

70

Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu  
80 85 90 95

Ala Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr  
100 105

71

**Patentansprüche**

1. Multicistronische Expressionseinheit zur äquimolaren Expression von Polypeptiden oder Untereinheiten derselben in Säugerzellen als Wirtszellen, gekennzeichnet durch die allgemeine Formel

10            p - 5'UTR - C<sub>1</sub> - (IRES - Y - C<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - 3'UTR - polyA,

in der

"p" ein transkriptionaler Promotor ist,

15            "5'UTR" eine nicht translatierte Nukleotidsequenz ist,

n 1, 2 oder 3 ist,

20            "C<sub>1</sub>" und "C<sub>2</sub>" Cistrons sind, welche jeweils ein für ein Polypeptid oder dessen Untereinheit kodierendes Gen enthalten, wobei dann, wenn n 2 oder 3 ist, die Sequenzen C<sub>2</sub> der aufeinanderfolgenden Gruppen (IRES-Y-C<sub>2</sub>) untereinander gleich oder verschieden sein können und ferner C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> gleich oder verschieden sein können,

25            "IRES" eine Nukleotidsequenz viralen, zellulären oder synthetischen Ursprungs ist, die in der Stufe der Translation für die interne Initiation verantwortlich ist,

30            "Y" eine Nukleotidsequenz ist, welche im Zusammenwirken mit IRES für eine Expression des (der) in C<sub>2</sub> enthaltenen Gens(e) auf solche Weise sorgt, daß die Genprodukte von C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> in äquimolaren Mengen exprimiert werden,

72

"3'UTR" eine nicht translatierte Nukleotidsequenz ist

und

5 "polyA" ein Polyadenylierungssignal ist.

2. Expressionseinheit nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß IRES die 5'UTR des Poliovirus Typ 1, 2 oder 3, des *Encephalomyocarditis Virus* (EMV), des "*Theilers murine encephalomyelitis virus*" (TMEV), des "*foot and mouth disease virus*" (FMDV), des "*bovine enterovirus*" (BEV), des "*cox-sackie B virus*" (CBV), des "*human rhinovirus*" (HRV) oder die "*human immunoglobulin heavy chain binding protein*" (BIP) 5'UTR, die *Drosophila Antennapediae* 5'UTR, die *Drosophila Ultrabithorax* 5'UTR oder genetische Hybride oder Fragmente aus den oben angeführten Sequenzen ist.
3. Expressionseinheit nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß IRES die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO: 5 ist.
4. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß "Y" die β-Globinsequenz aus *Xenopus laevis*, die *Alfalfa mosaic virus* RNA4 5' UTR, Ferritin 5' UTR (animal), *Tobacco mosaic virus* 5' UTR (Omega) oder deren Leadermutanten, *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) 5' UTR, *Brome mosaic virus* (BMV) RNA3 5' UTR, *Rous sarcoma virus* (RSV) 5' UTR, *Adenovirus tripartite leader* (L1-3) und Varianten derselben, *Xenopus borealis* 5' UTR β-Globin oder *Xenopus tropicalis* 5' UTR β-Globin Sequenz ist.
5. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß "Y" die β-Globinsequenz aus *Xenopus laevis* gemäß SEQ ID NO: 6, ein Fragment oder eine Variante derselben ist.

73

6. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß IRES die *Poliovirus* Typ 1 UTR gemäß SEQ ID NO: 5 und "Y" die β-Globinsequenz aus *Xenopus laevis* gemäß SEQ ID NO: 6 sind.

5

7. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> jeweils Gene enthalten, die für Polypeptid-Untereinheiten singulärer oder heteromerer Proteine kodieren.

10

8. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> jeweils Gene enthalten, welche für die verschiedenen Untereinheiten von Faktor VIII, Kreatin-Kinase, Hämoglobin, Immunglobulinen, Histokompatibilitäts-Antigenen, Scatter-Faktor (HGF-SF), Mitgliedern der Familie des Transforming Growth Factor Typ β, des Bone Morphogenic Proteins (BMP) Mitgliedern der Integrin-Familie, PDGF oder deren natürliche oder synthetische Varianten und Derivate enthalten.

20

9. Expressionseinheit nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß "n" 1 ist und C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> alternativ ein für die A- oder die B-Kette von PDGF, ein biologisch aktives Analogon oder ein Fragment derselben kodierendes Gen enthalten, wobei beide Gene gleichzeitig in der Expressionseinheit vertreten sind.

25

10. Expressionseinheit nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß C<sub>1</sub> oder C<sub>2</sub> die PDGF-A<sub>K</sub>- (SEQ ID Nr. 1) oder die PDGF-A<sub>L</sub>-Vorläufer-Sequenz enthält.

30

11. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß C<sub>1</sub> oder C<sub>2</sub> die vollständige PDGF-B-Vorläufersequenz (SEQ ID Nr. 3), das v-sis-Gen aus Simian Sarcoma Virus oder Varianten dieser Sequenzen.

35

74

12. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß C<sub>1</sub> oder C<sub>2</sub> ein Genfragment enthalten, das für ein PDGF-B-Vorläufermolekül kodiert, welches durch Ersetzen des für Arginin kodierenden Kodons in der Aminosäureposition 191 durch ein Translations-Stop-Kodon verkürzt ist (SEQ ID Nr. 24).  
5
13. Expressionseinheit nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> alternativ die PDGF-A<sub>K</sub>-Sequenz (SEQ ID Nr. 1) 10 oder die verkürzte PDGF-B190 Vorläufersequenz (SEQ ID Nr. 24) enthalten und beide Gene gleichzeitig in der Expressionseinheit vertreten sind.
14. Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß "n" 1 ist und C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> voneinander 15 verschiedene Reportergene enthalten.
15. Expressionseinheit nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Reportergene für Luciferase bzw. für sekretorische alkalische Phosphatase kodieren.  
20
16. Rekombinanter DNA-Vektor, welcher eine Expressionseinheit nach den Ansprüchen 1 bis 15, operativ insertiert enthält.
- 25 17. Wirtszelle, welche eine Säugerzelle transformiert mit einem Vektor gemäß Anspruch 16 ist.
18. Wirtszelle nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine CHO- oder BHK-Zelle ist.  
30
19. Wirtszelle dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Säugerzelle ist, die mit einem Vektor transformiert ist, welcher die Expressionseinheit nach den Ansprüchen 9 bis 13 operativ insertiert enthält.

20. Wirtszelle nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine CHO- oder BHK-Zelle ist.
21. Wirtszelle nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine PDGF-AB produzierende BHK-Zelle ist, die von einem der Klone 92-22-6 entsprechend DSM ACC 2048 oder 92-22-7 entsprechend DSM ACC 2049 abstammt.  
5
22. Verfahren zur Herstellung von Proteinen bestehend aus äquimolaren Anteilen von Polypeptiduntereinheiten, dadurch gekennzeichnet, daß man Wirtszellen nach den Ansprüchen 17 bis 21 in einem geeigneten Medium kultiviert und das so erzeugte Protein von den Zellen und dem Medium abtrennt.  
10
23. Verfahren nach Anspruch 22 zur Herstellung von heteromeren Proteinen.  
15
24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein Faktor VIII, Kreatin-Kinase, Hämoglobin, ein Immunglobulin, ein Histokompatibilitäts-Antigen, Scatter-Faktor (HGF-SF), ein Mitglied der Transforming Growth Factor Typ β-Familie, Bone-Morphogenic Protein (BMP), ein Mitglied der Integrin-Familie, PDGF oder eine natürliche oder synthetische Variante oder ein Derivat derselben ist.  
20
25. Verfahren zur Herstellung von heteromerem rPDGF-AB, dadurch gekennzeichnet, daß man Wirtszellen nach den Ansprüchen 19 bis 21 in einem geeigneten Medium kultiviert und das so erzeugte rPDGF-AB von den Zellen und dem Medium abtrennt.  
25
26. Heterodimeres rPDGF-AB, im wesentlichen frei von homodimären Begleitprodukten, erhältlich durch Kultivieren von Säugerzellen als Wirtszellen, die eine Expressionseinheit nach den Ansprüchen 9 bis 13 operativ verknüpft enthalten, in einem geeigneten Medium und Abtrennen des so erzeugten rPDGF-AB von den Zellen und dem Medium.  
30  
35

27. Heterodimeres rPDGF-AB nach Anspruch 26, **erhältlich durch Kultivieren von BHK- oder CHO-Zellen als Wirtszellen.**
28. Heterodimeres, im wesentlichen von homodimeren Begleitprodukten freies rPDGF-AB, **erhältlich durch Kultivieren von Wirtszellen nach den Ansprüchen 19 bis 21, in einem geeigneten Medium und Abtrennen des so erzeugten rPDGF-AB von den Zellen und dem Medium.**
- 10 29. Pharmazeutisches und/oder kosmetisches Präparat, enthaltend rPDGF-AB nach den Ansprüchen 26 bis 28 zusammen mit pharmazeutisch und/oder kosmetisch verträglichen Hilfs- und Trägerstoffen.
- 15 30. Pharmazeutisches Präparat, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Salbe, ein Spray, Gel, Wundverband, ein Pflaster oder eine Wundauflage ist.
31. Wirtszelle **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine Säugerzelle ist, die mit einem Vektor transformiert ist, welcher die Expressionseinheit nach den Ansprüchen 14 oder 15 operativ insertiert enthält.
32. Wirtszelle nach Anspruch 31, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie von einem der Klone 91-46-9 entsprechend DSM ACC 2046 oder 91-46-10 entsprechend DSM ACC 2047 abstammt.
33. Verfahren zum Auffinden von translations-beeinflussenden Sequenzen "Y", welche im Zusammenwirken mit IRES in Expressionseinheiten nach den Ansprüchen 1 bis 15 die äquimolare Expression der Genprodukte von C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> bewirken, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
  - (a) die zu untersuchenden Sequenzen als Y in Expressionseinheiten nach den Ansprüchen 1, 14 oder 15 einbringt,

77

(b) Vektoren konstruiert, welche die jeweilige Expressionseinheit operativ insertiert enthalten,

5 (c) Säugerzellen als Wirtszellen mit den Vektoren aus Stufe (b) transformiert und in einem geeigneten Medium kultiviert, und

10 (d) die Expressionsprodukte von  $C_1$  und  $C_2$  in dem Medium oder nach Abtrennen von den Zellen und/oder dem Medium quantifiziert.

34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß in Stufe (c) CHO- oder BHK-Zellen als Wirtszellen verwendet werden.

15 35. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß in Stufe (c) Wirtszellen gemäß Anspruch 30 verwendet werden.

20 36. Verfahren nach den Ansprüchen 33 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß IRES eine Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 5 ist.

25 37. Verfahren zum Auffinden von translations-initiiierenden Sequenzen IRES, welche im Zusammenwirken mit "Y" in Expressionseinheiten nach den Ansprüchen 1 bis 15 die äquimolare Expression der Genprodukte von  $C_1$  und  $C_2$  bewirken, dadurch gekennzeichnet, daß man

30 (a) die zu untersuchenden Sequenzen als IRES in Expressionseinheiten nach den Ansprüchen 1, 14 oder 15 einbringt,

(b) Vektoren konstruiert, welche die jeweilige Expressionseinheit operativ insertiert enthalten,

78

(c) Säugerzellen als Wirtszellen mit den Vektoren aus Stufe (b) transformiert und in einem geeigneten Medium kultiviert, und

5 (d) die Expressionsprodukte von C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> in dem Medium oder nach Abtrennen von den Zellen und/oder dem Medium quantifiziert.

10 38. Verfahren nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß in Stufe (c) CHO- oder BHK-Zellen als Wirtszellen verwendet werden.

15 39. Verfahren nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß in Stufe (c) Wirtszellen gemäß Anspruch 31 verwendet werden.

40. Verfahren nach den Ansprüchen 37 bis 39, dadurch gekennzeichnet, daß "Y" eine Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 6 ist.

Figur 1/1

1/23

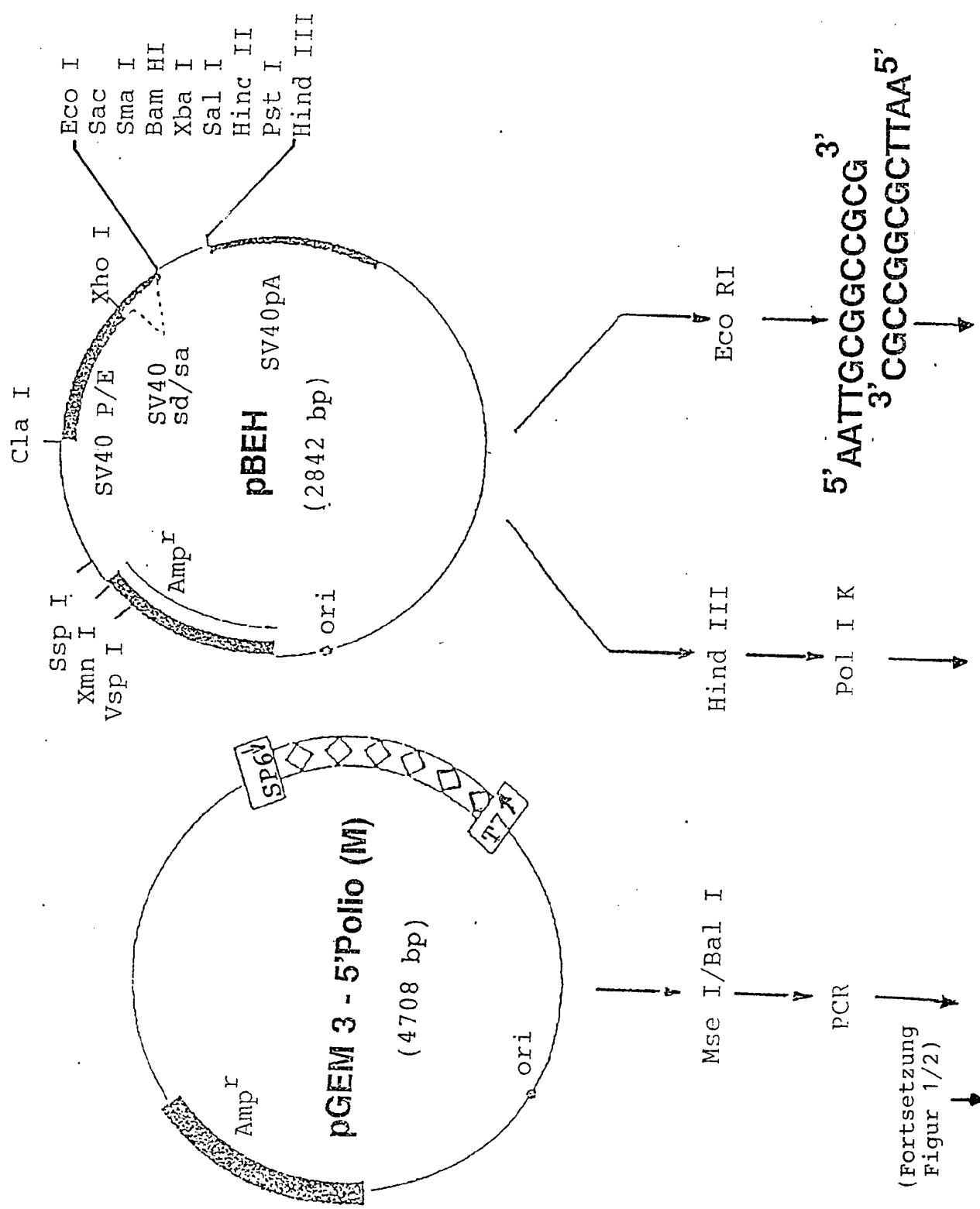
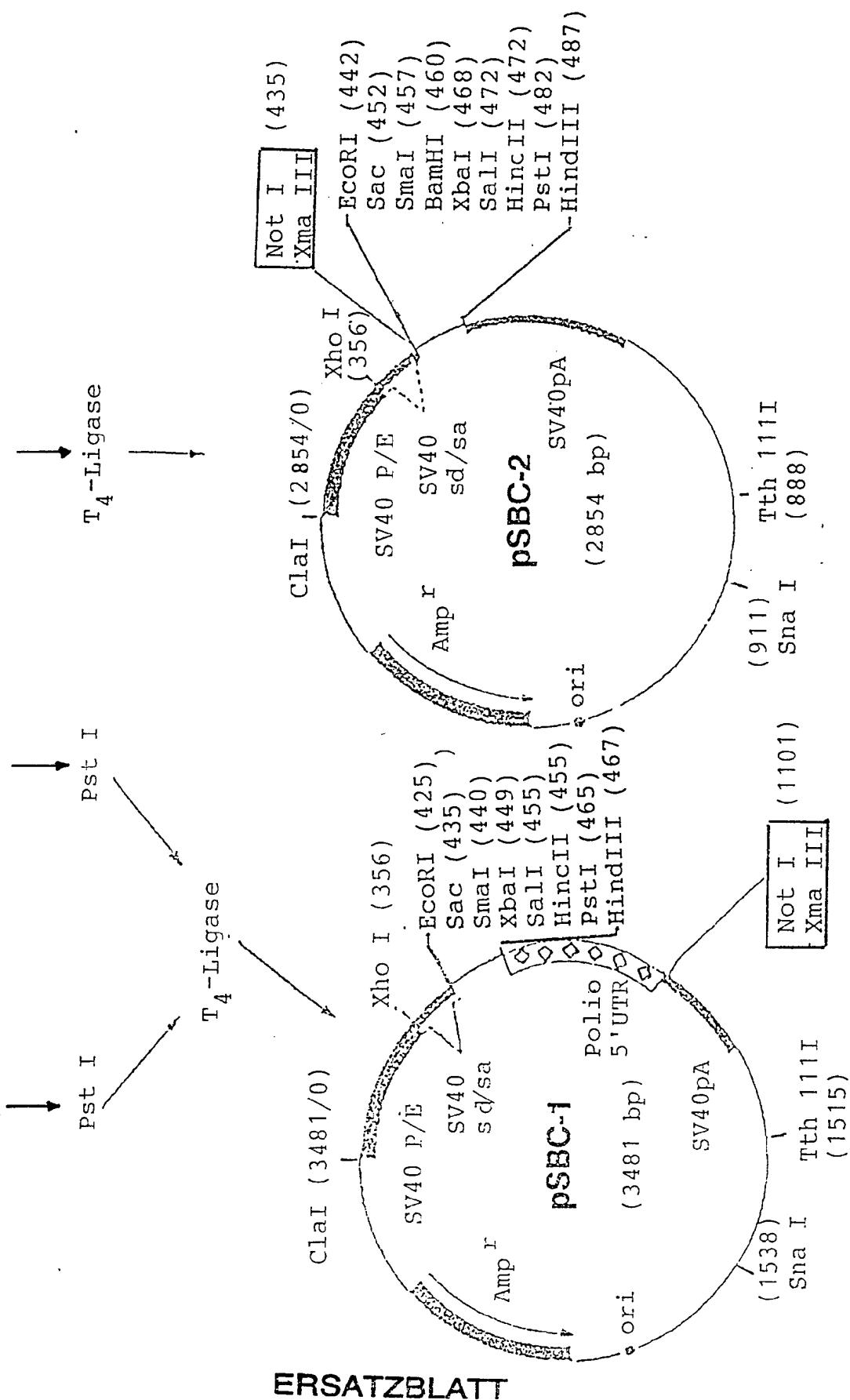


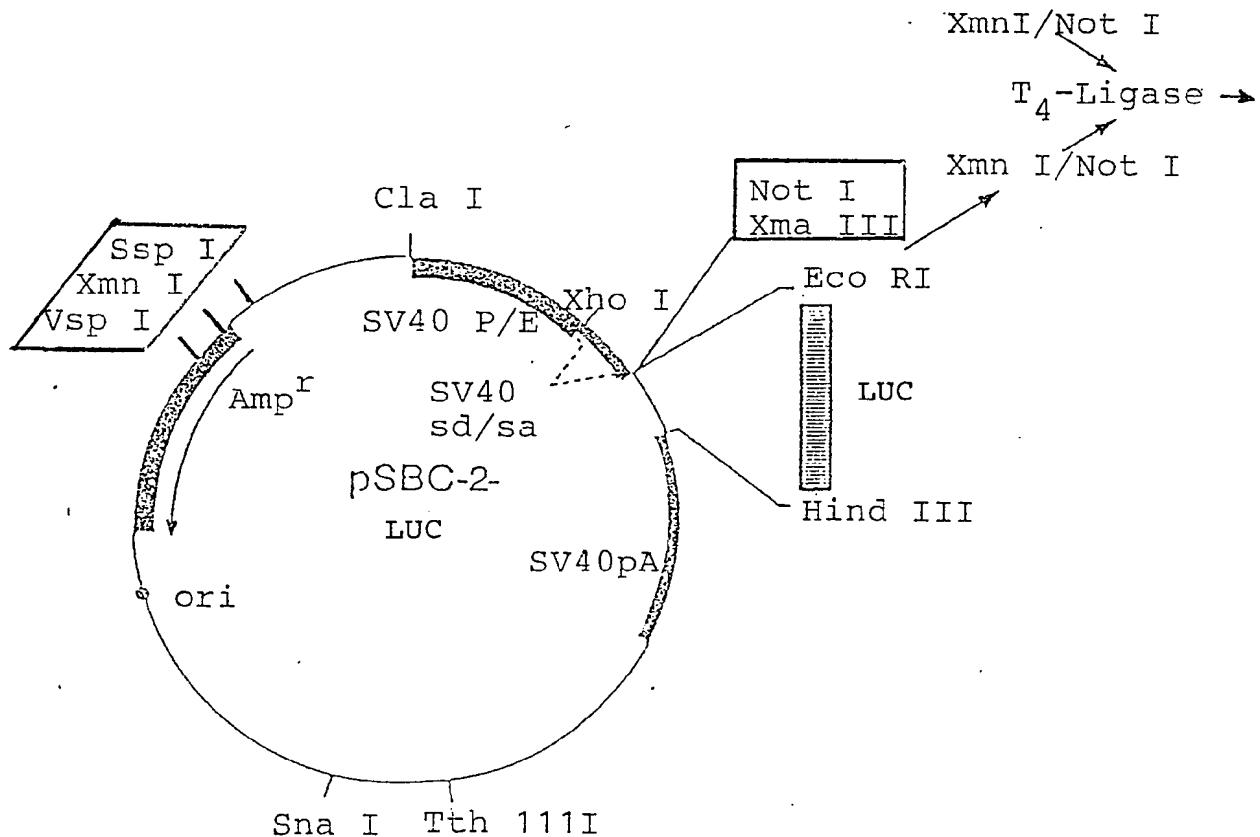
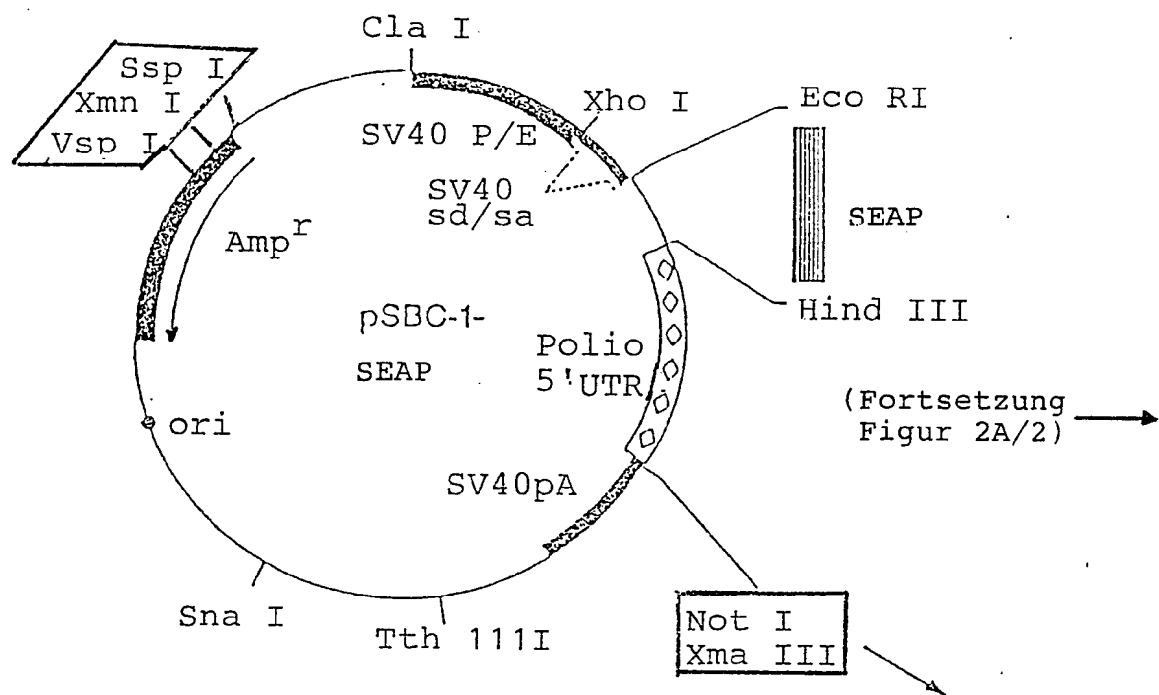
Figure 1/2

N/23



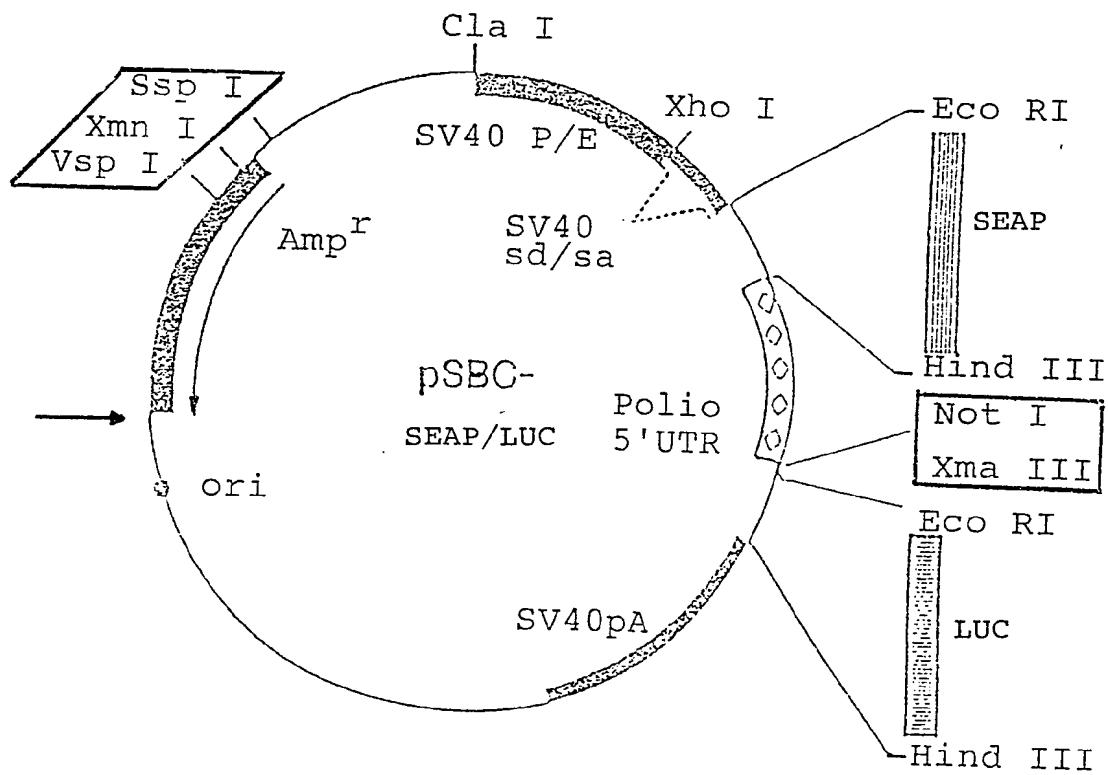
Figur 2A/1

3/23



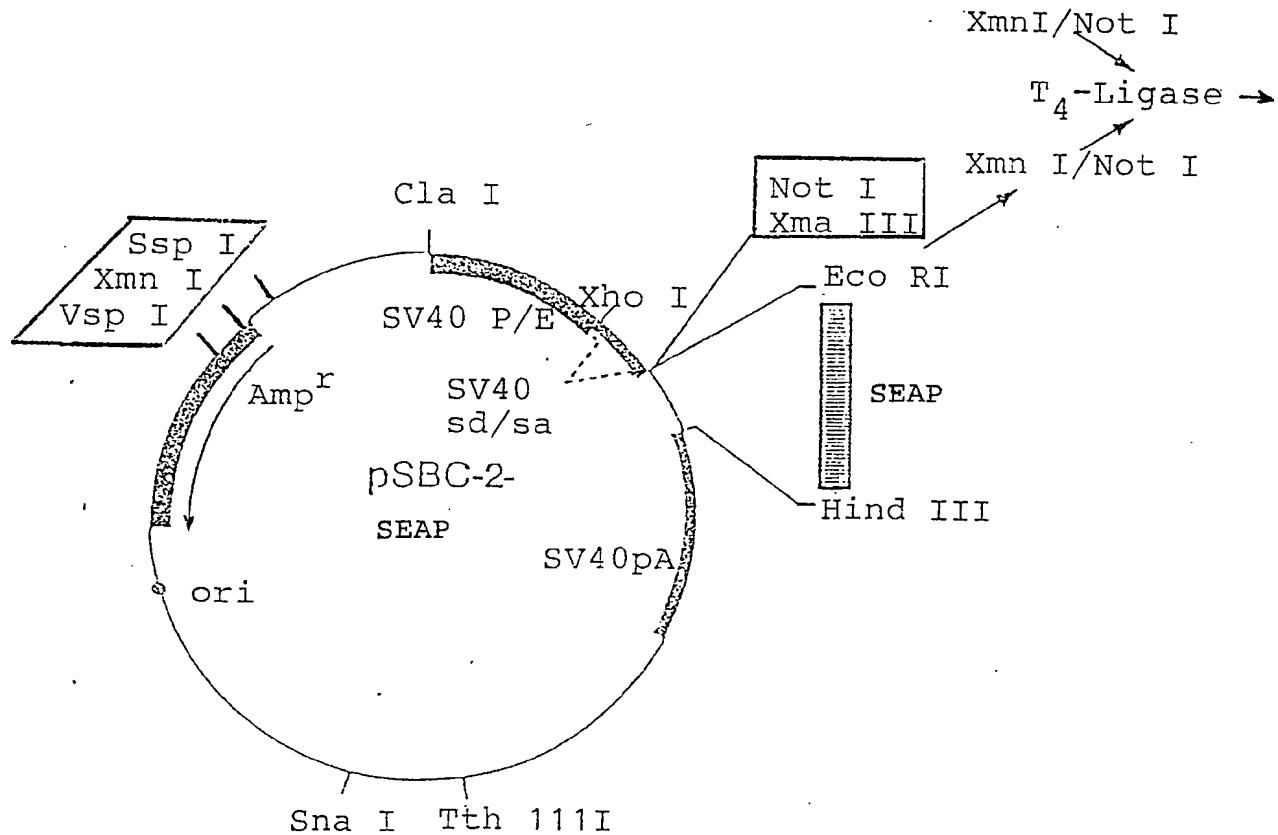
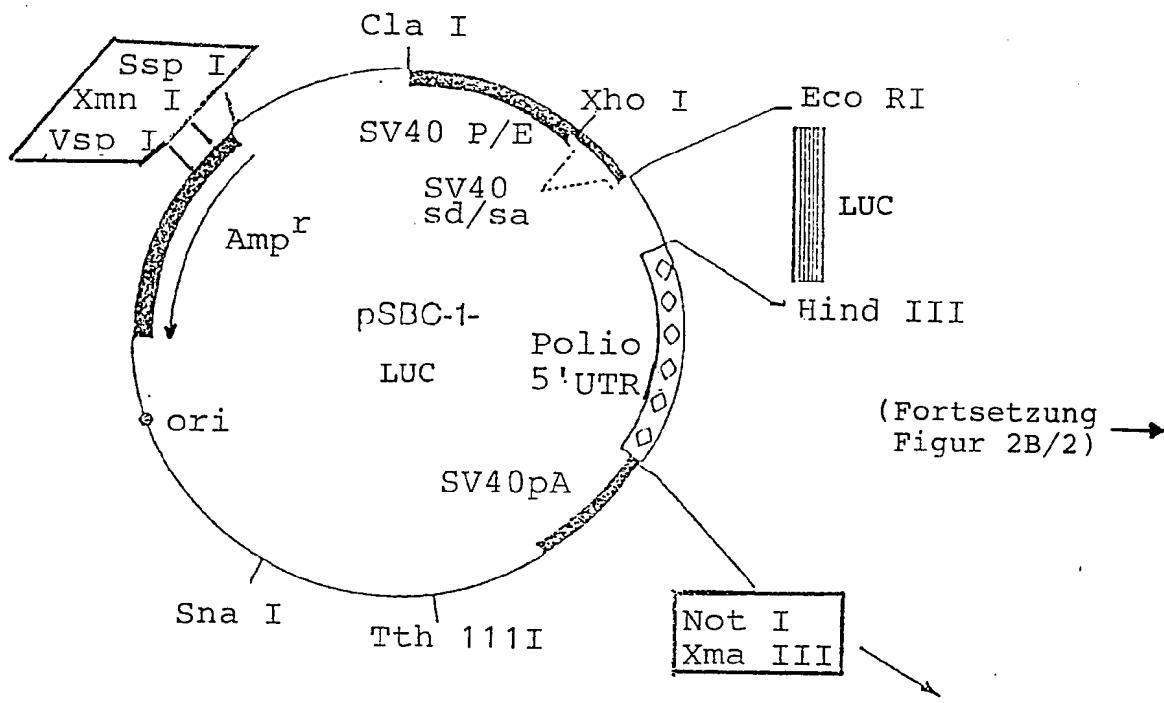
4/23

Figur 2A/2



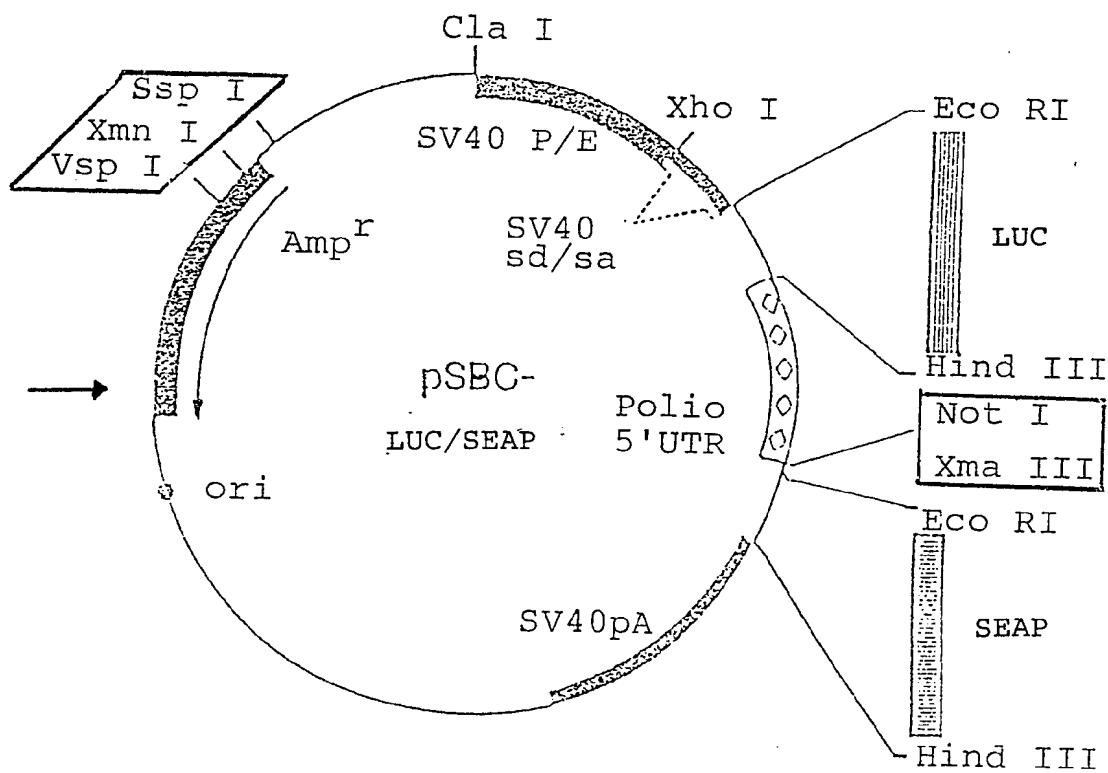
Figur 2B/1

5/23



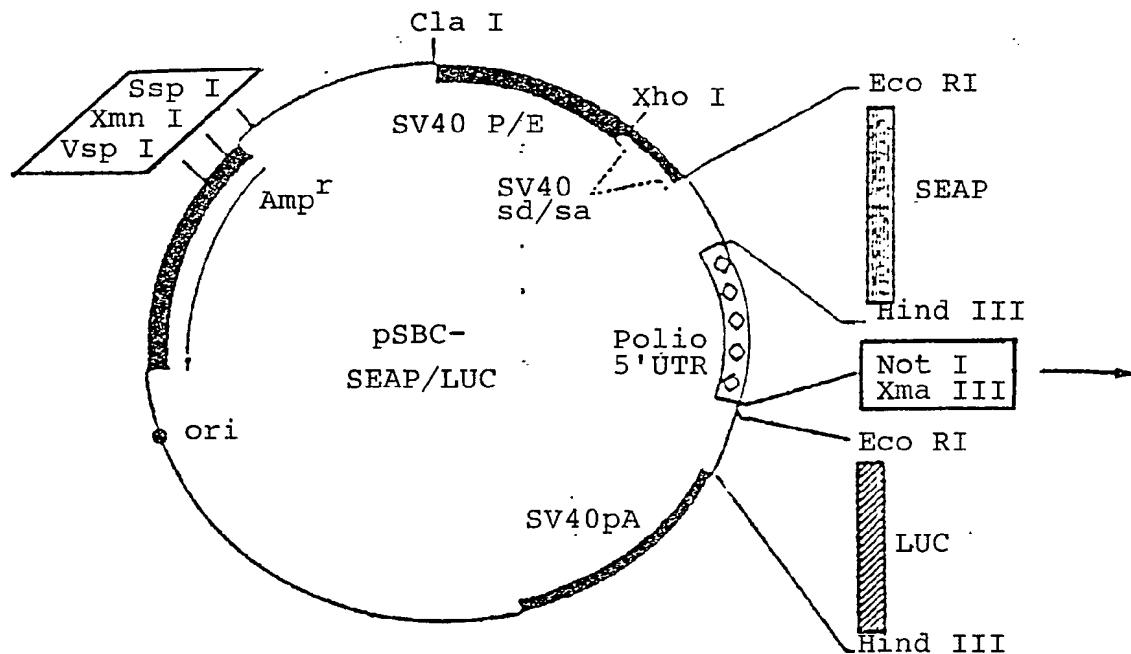
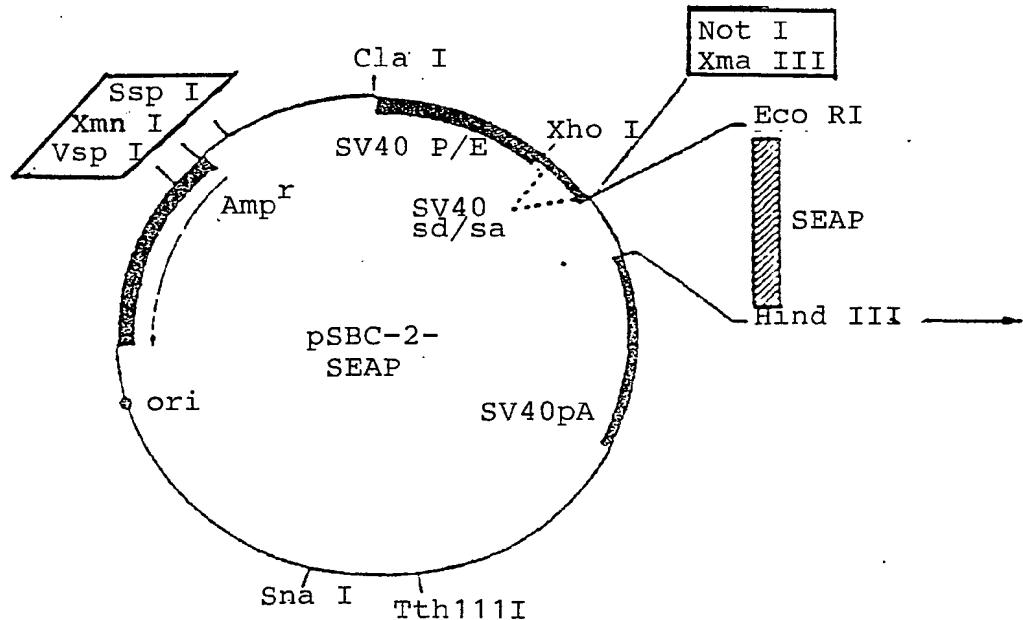
Figur 2B/2

6/23



Figur 2C/1

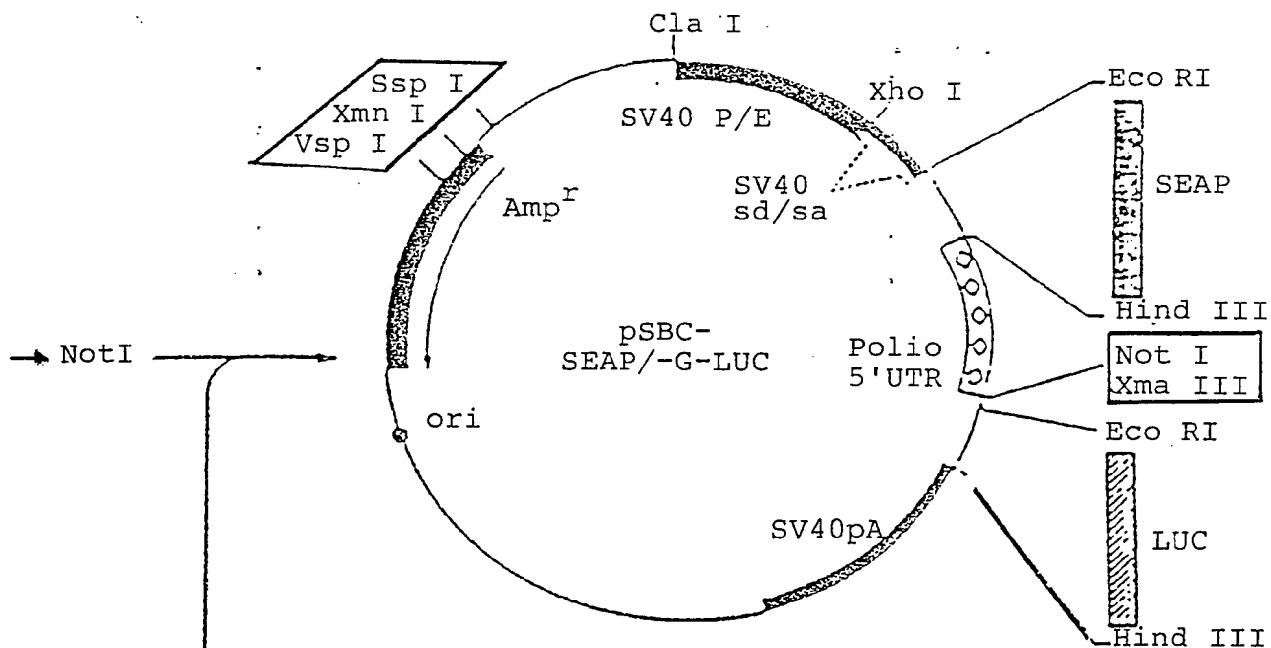
7/23

(Fortsetzung  
Figur 2C/2) →

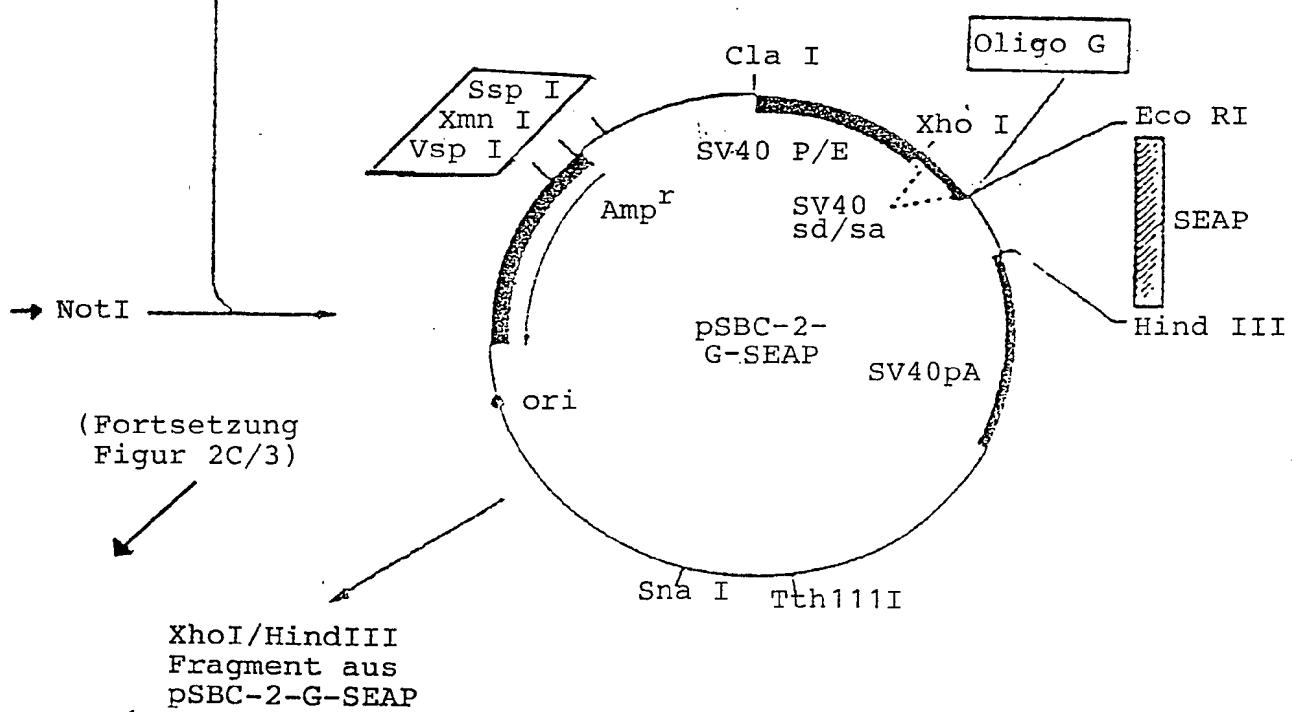
ERSATZBLATT

Figur 2C/2

8/23



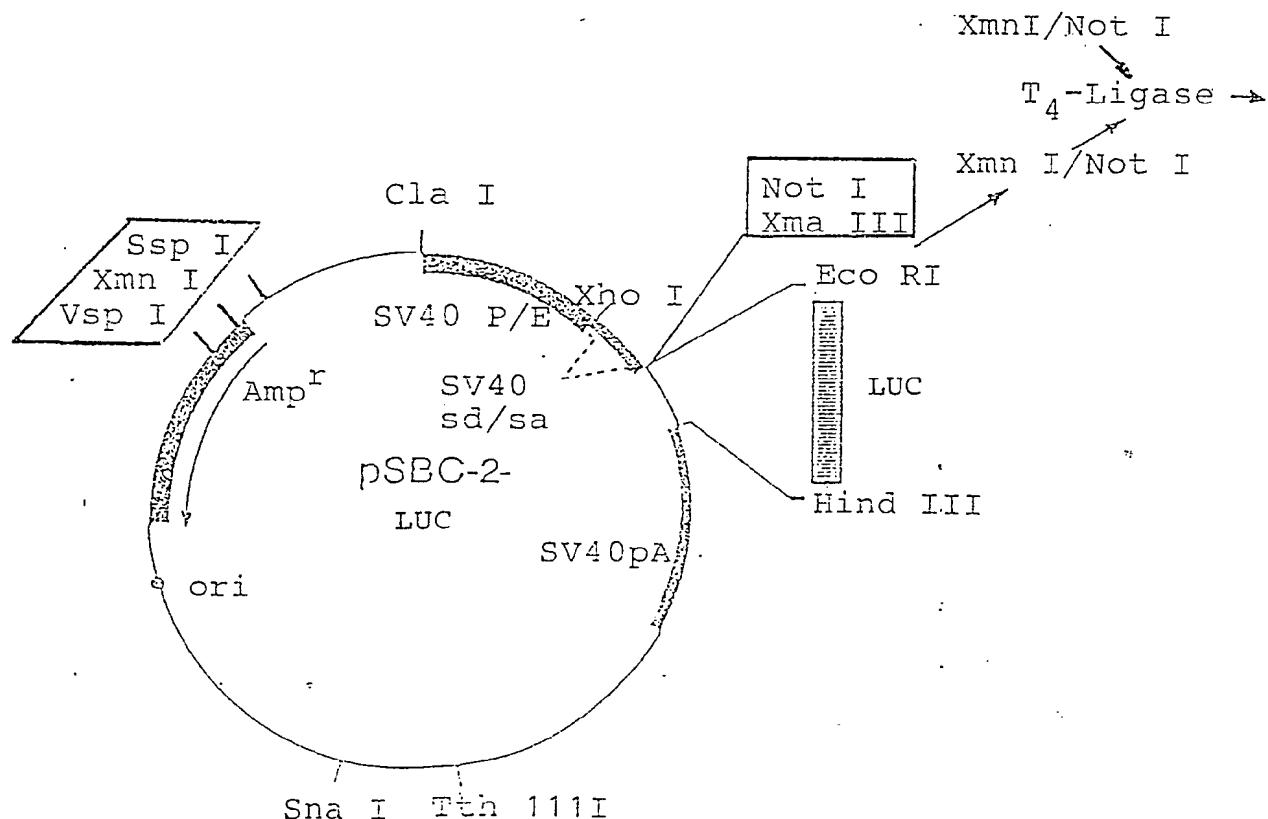
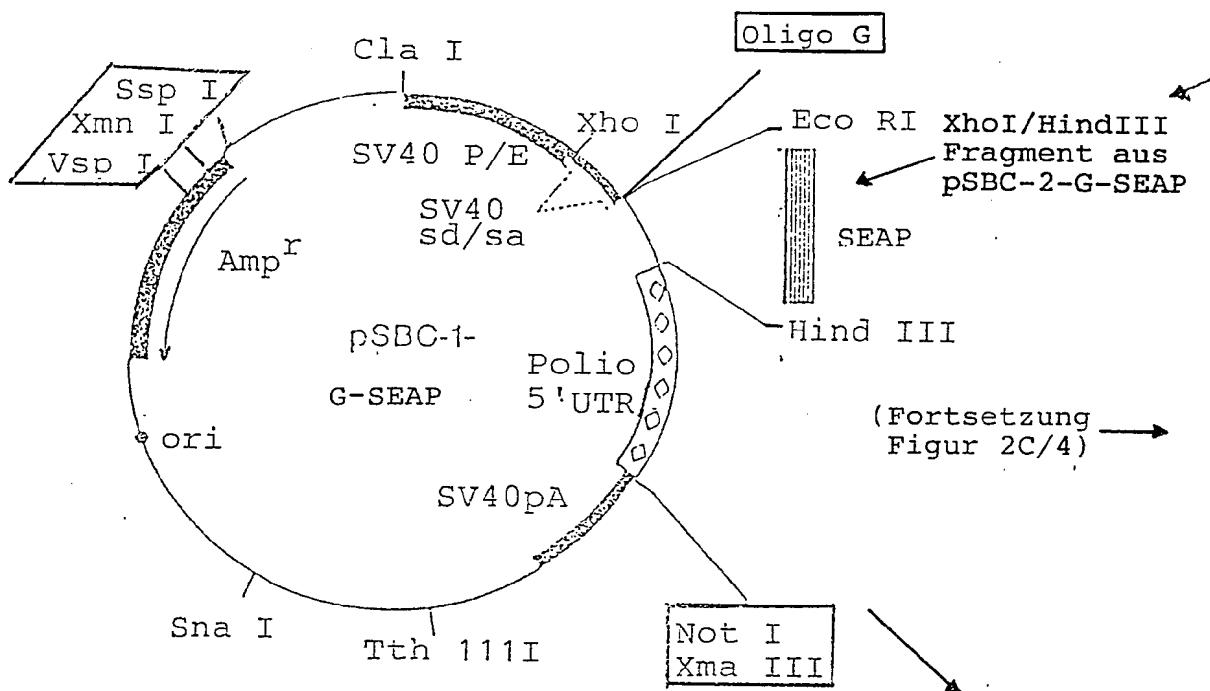
Oligo G

(Fortsetzung  
Figur 2C/3)XbaI/HindIII  
Fragment aus  
pSBC-2-G-SEAP

ERSATZBLATT

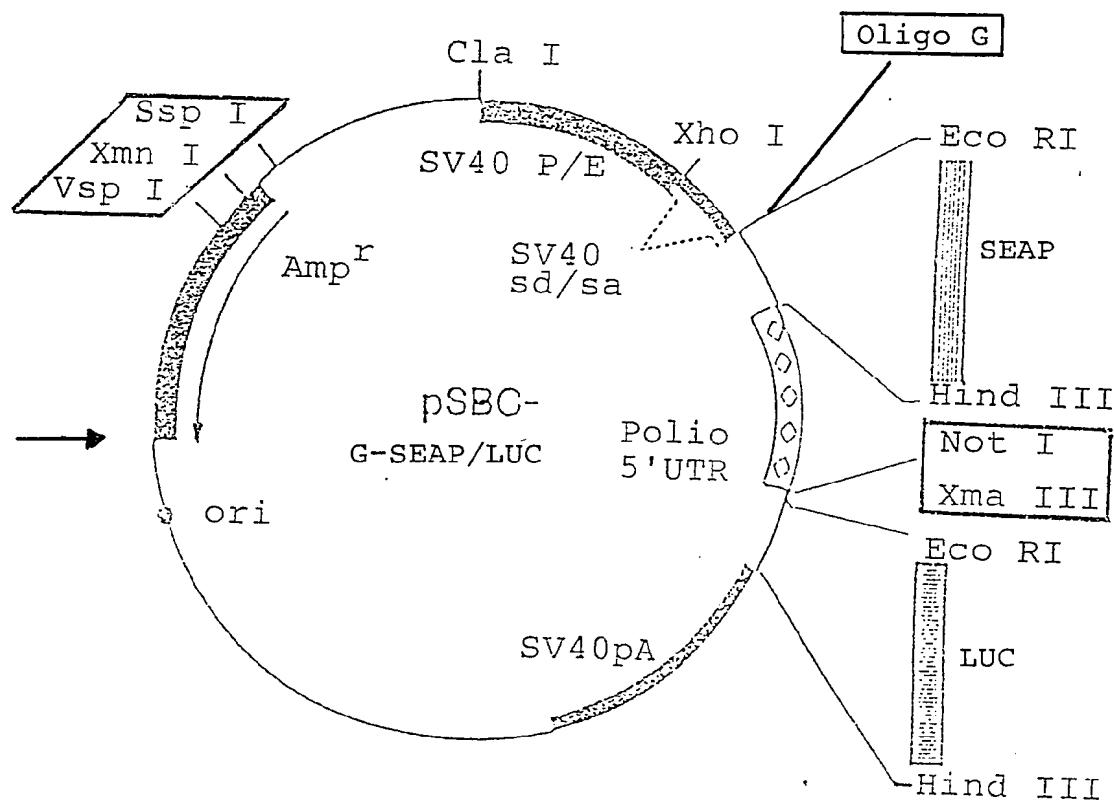
Figur 2C/3

g/23



Figur 2C/4

10/23



ERSATZBLATT

Figure 3

11/23

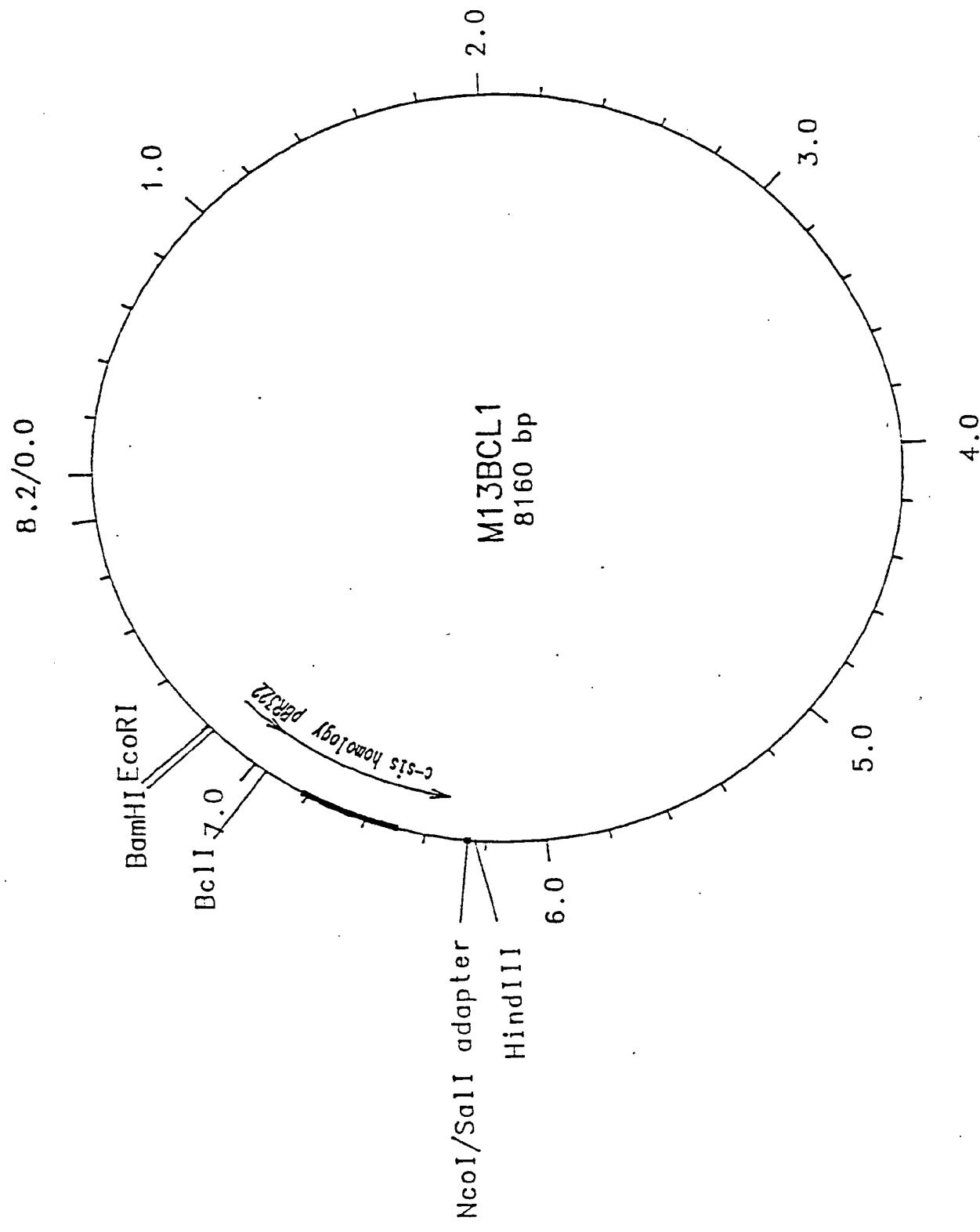
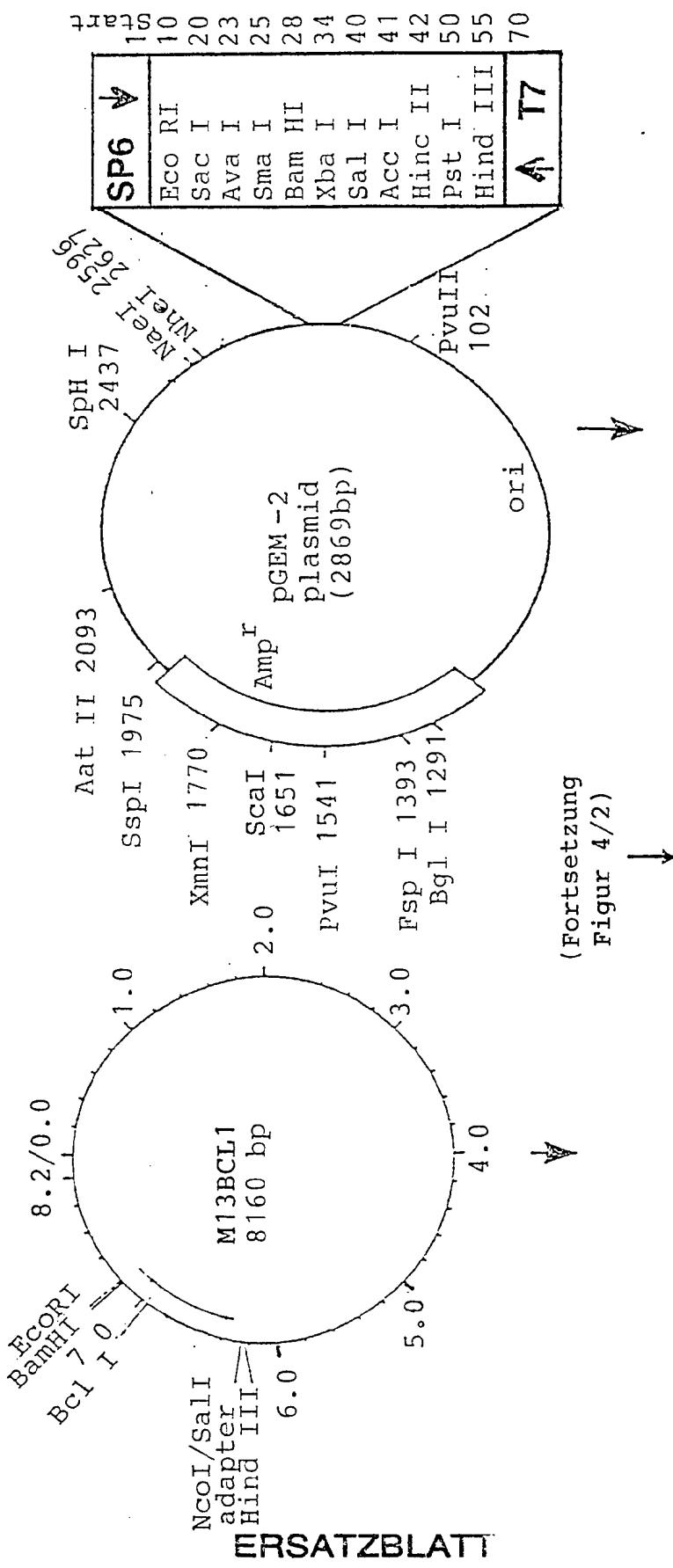


Figure 4/1

12/23

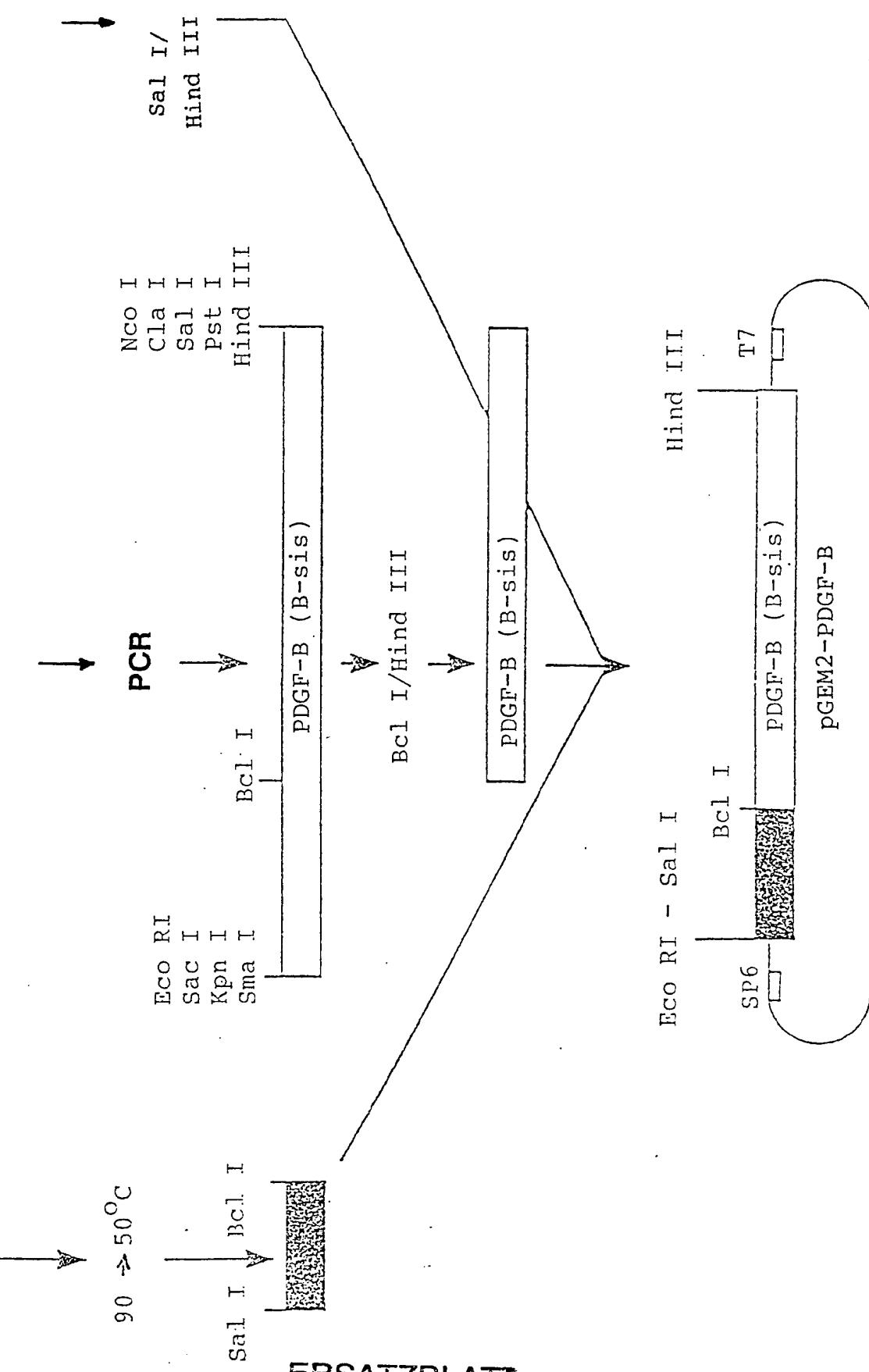


Figur 4/2

13/23

PPDGF-B1  
PPDGF-B2

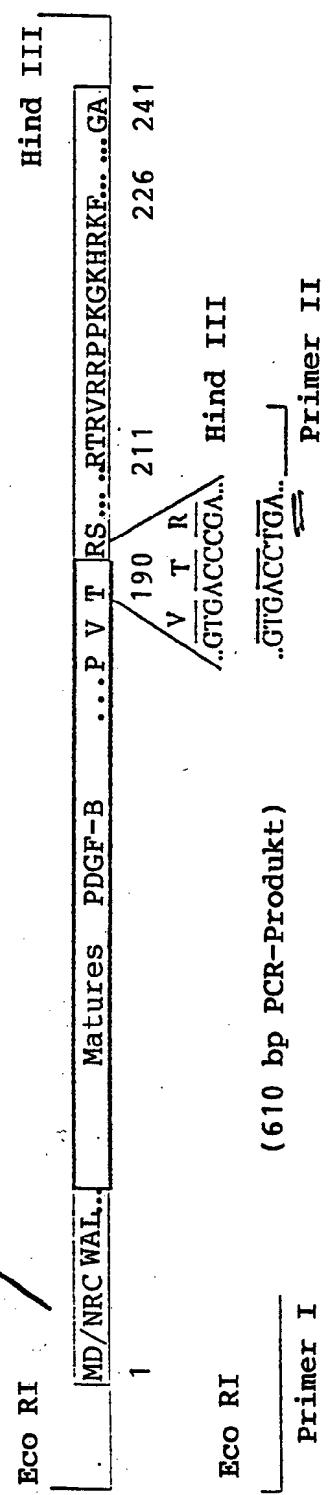
90  $\Rightarrow$  50°C



Figur 5

14/23

## Mutagenese von PDGF-B

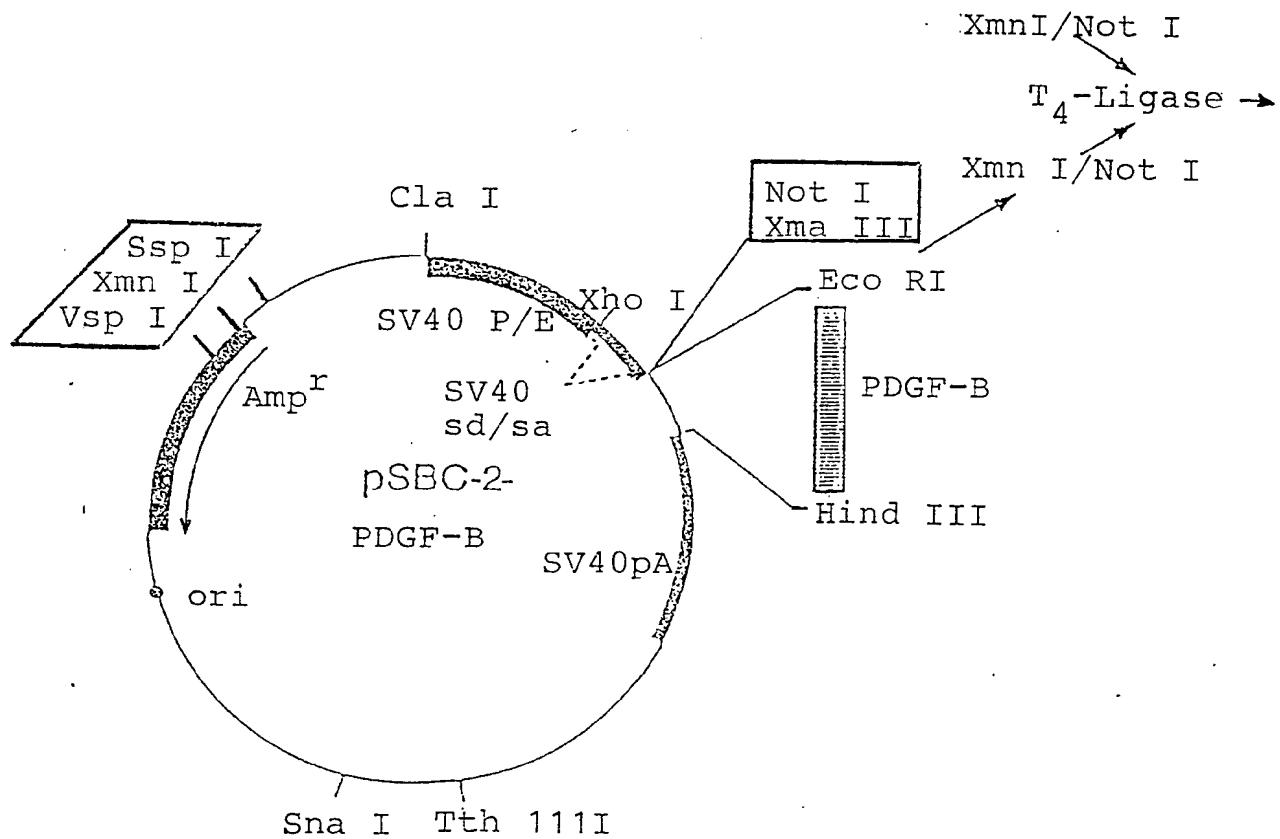
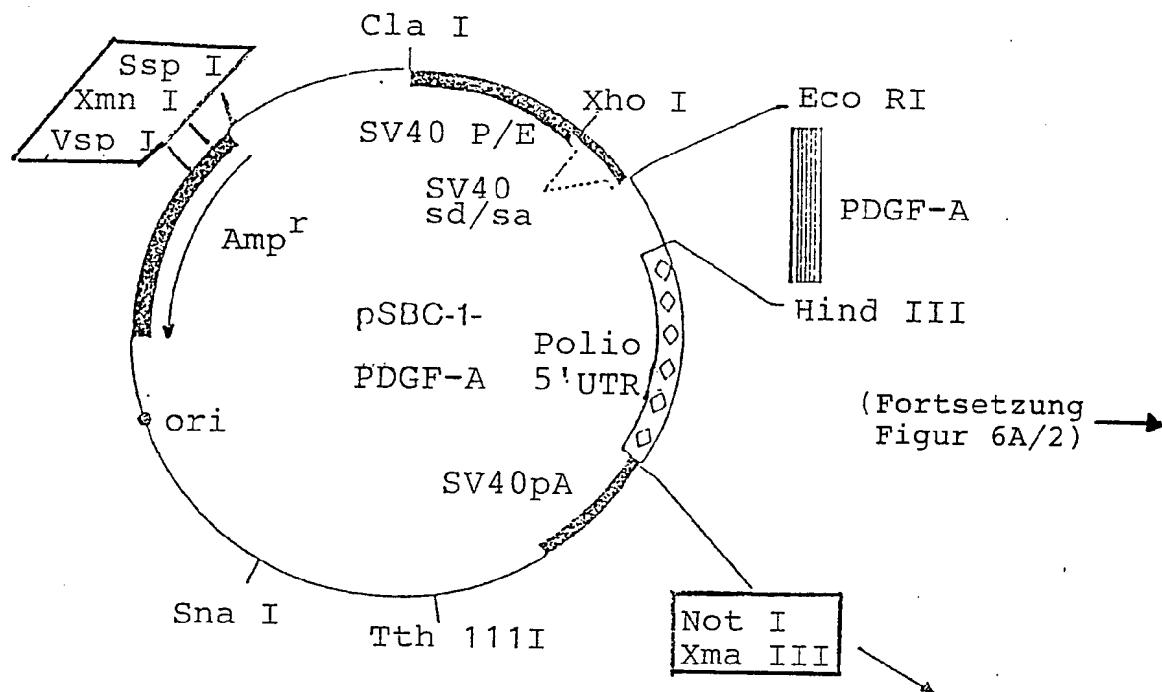


BERICHTIGTES BLATT (REGEL 91)

SAF

Figur 6A/1

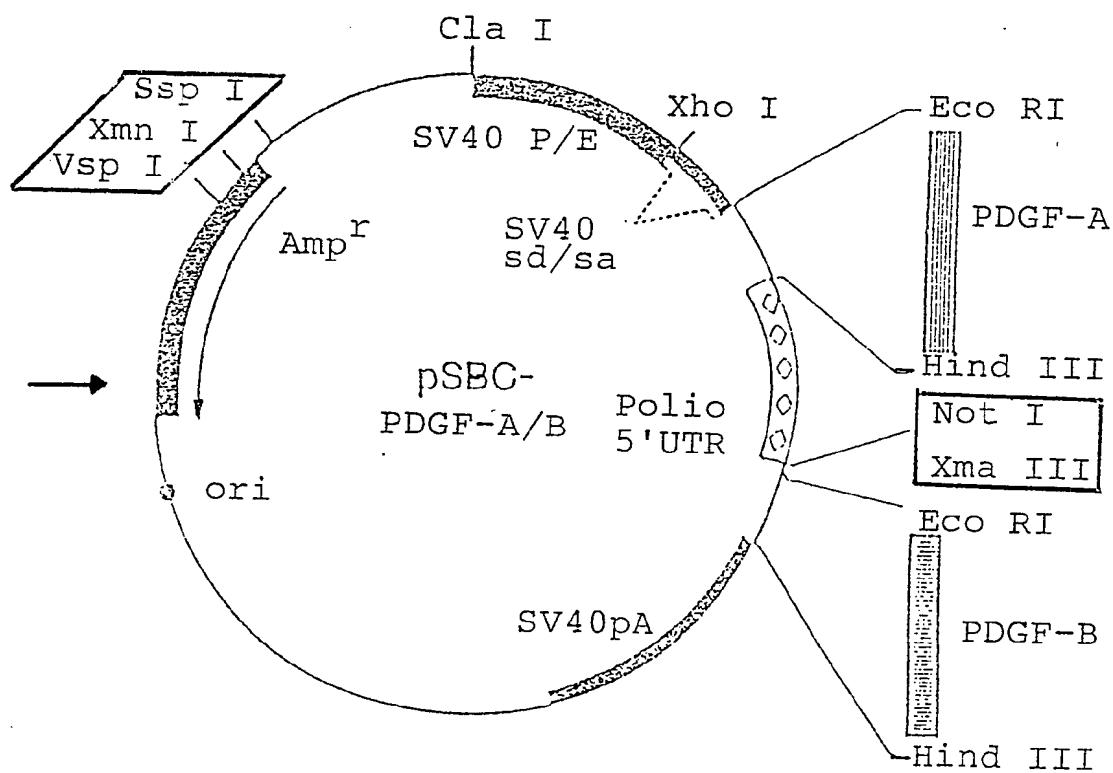
15/23



ERSATZBLATT

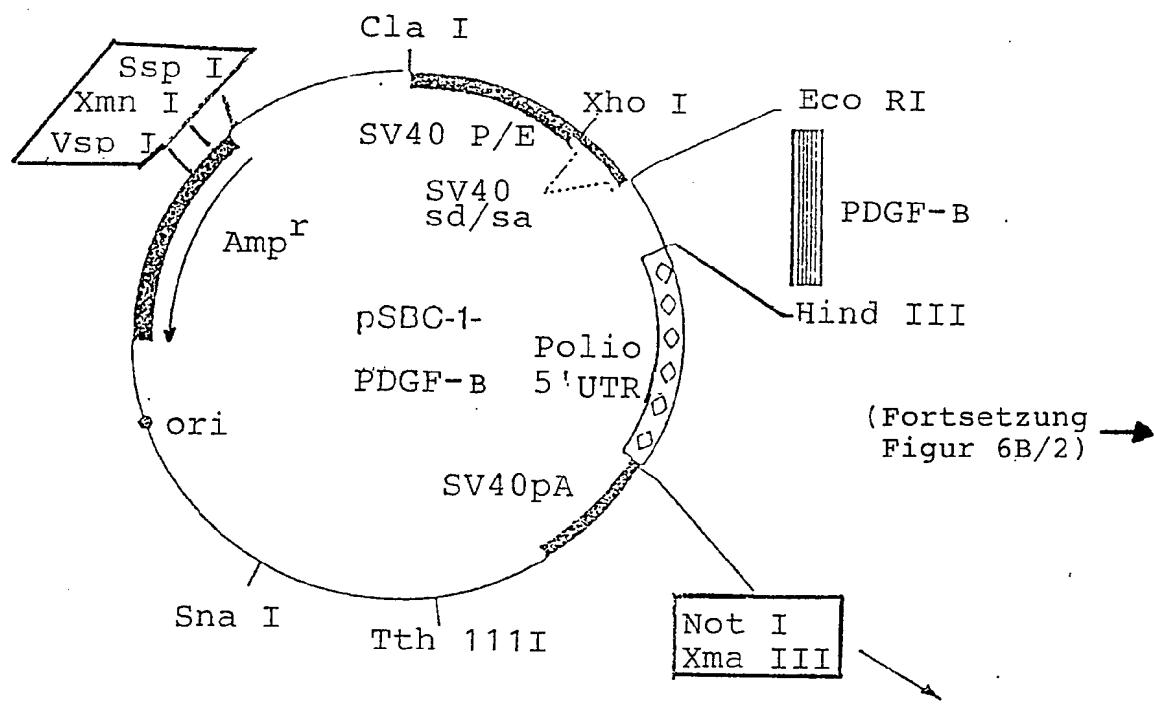
Figure 6A/2

16/23

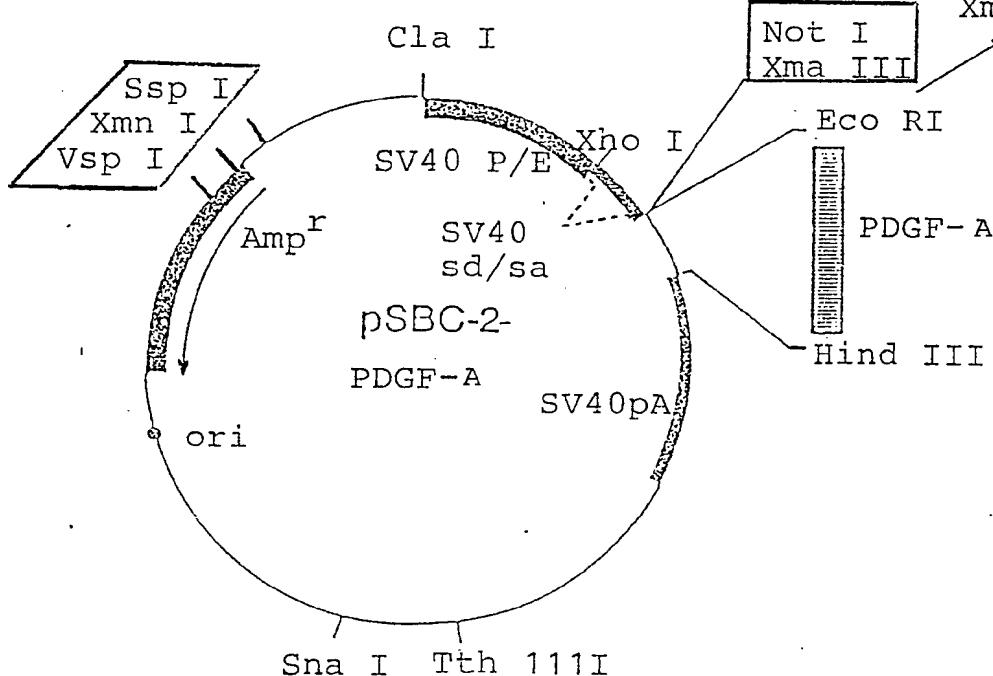


Figur 6B/1

17/23



Xmn I/Not I  
T<sub>4</sub>-Ligase →  
Xmn I/Not I



ERSATZBLATT

Figur 6B/2

18/23

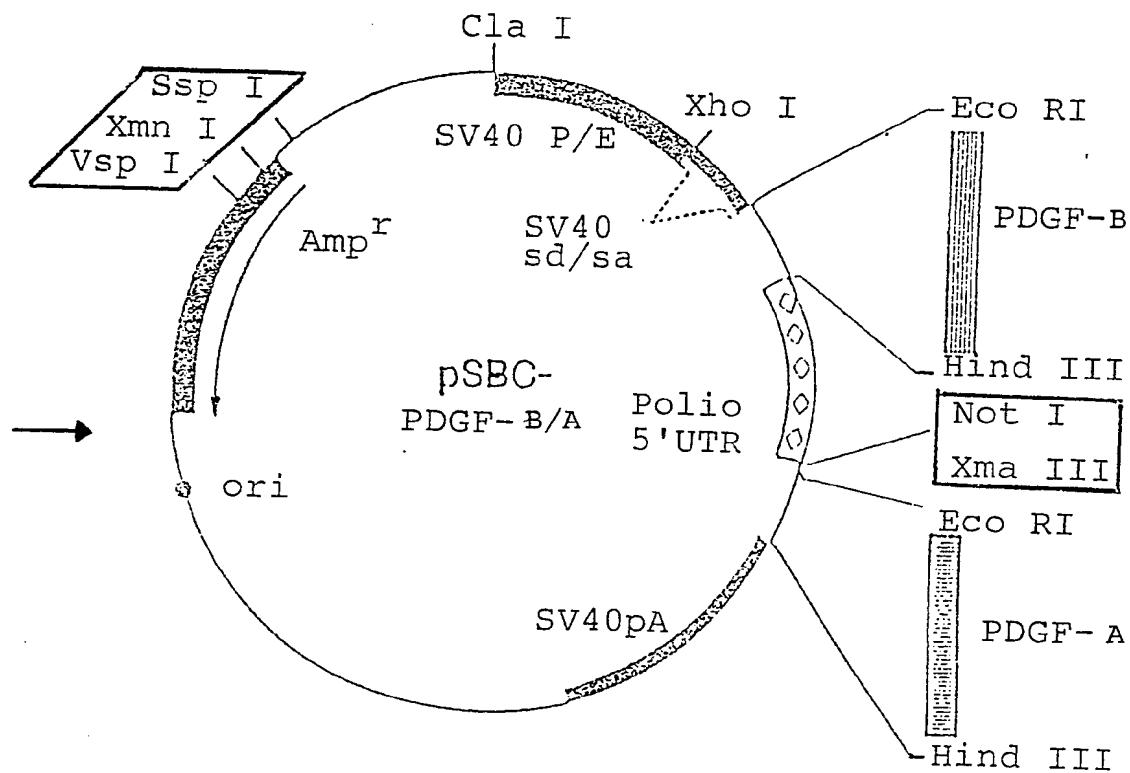
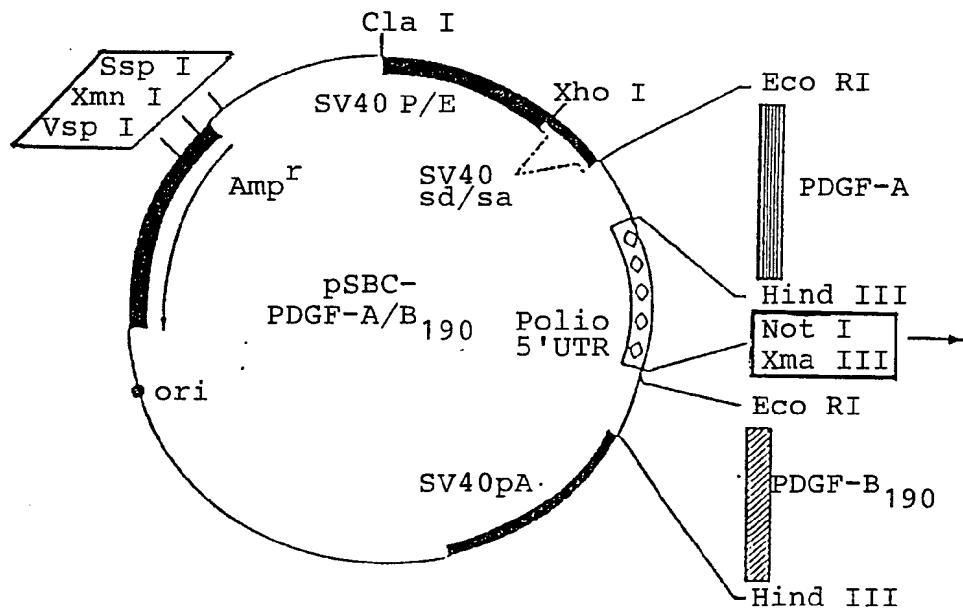
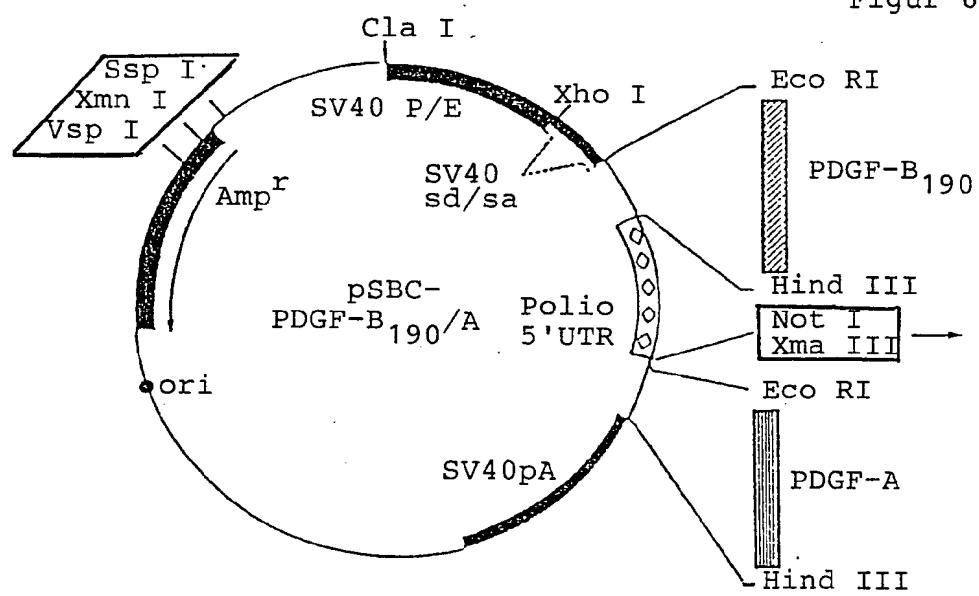


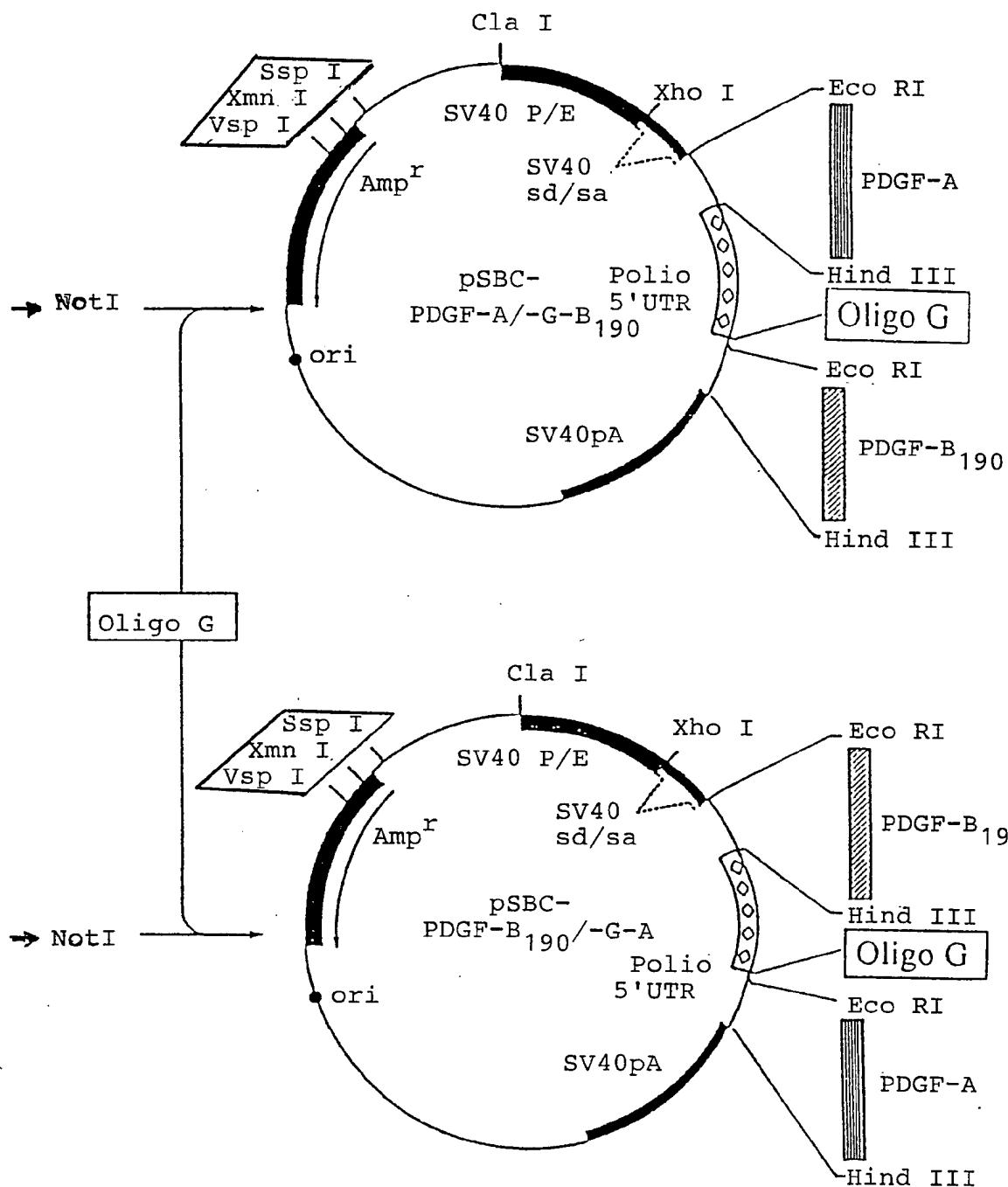
Figure 6C/1

19/23

(Fortsetzung →  
Figur 6C/2)

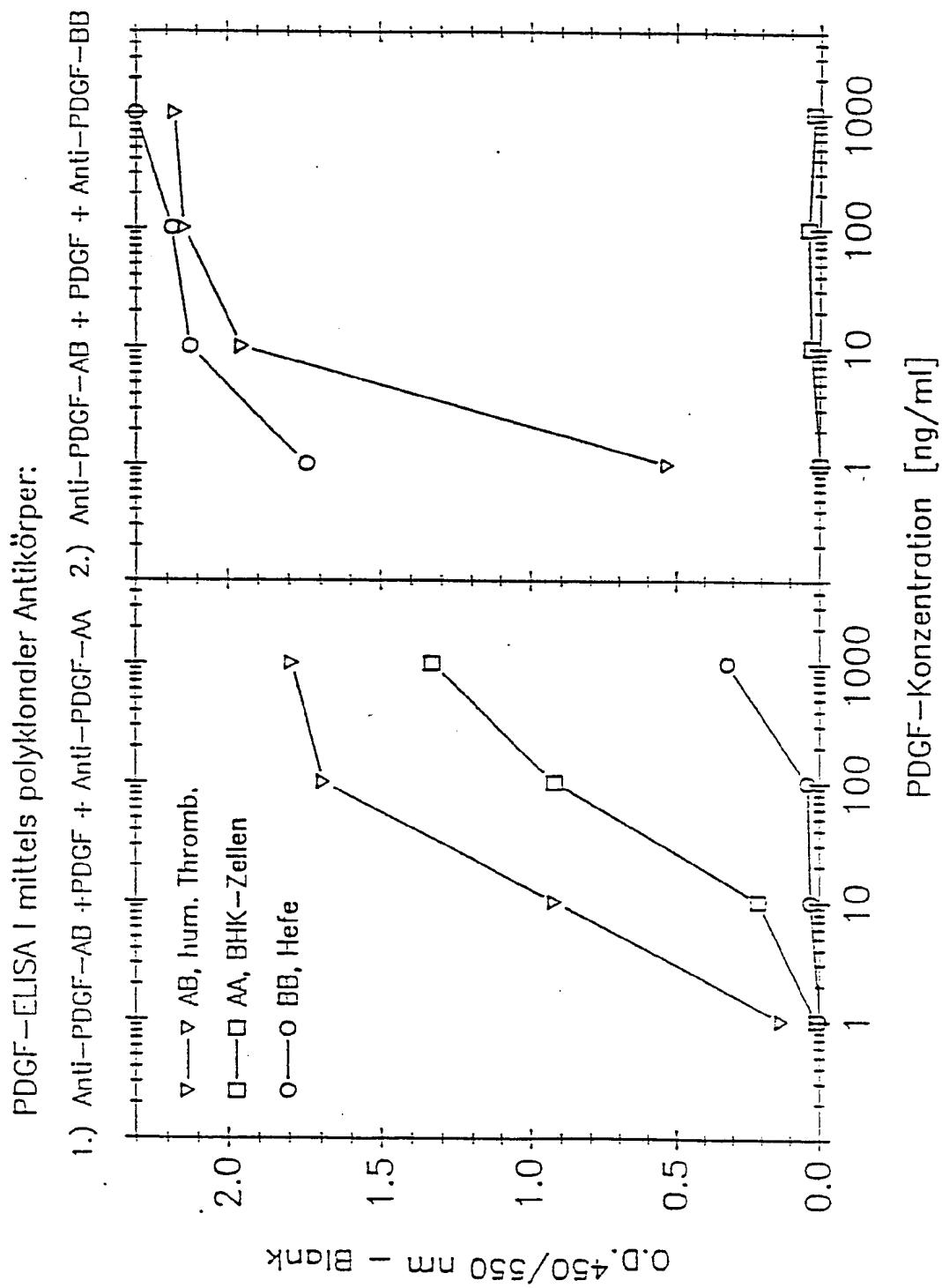
Figur 6C/2

20/23



Figur 7

21/23



Figur 8

22/23

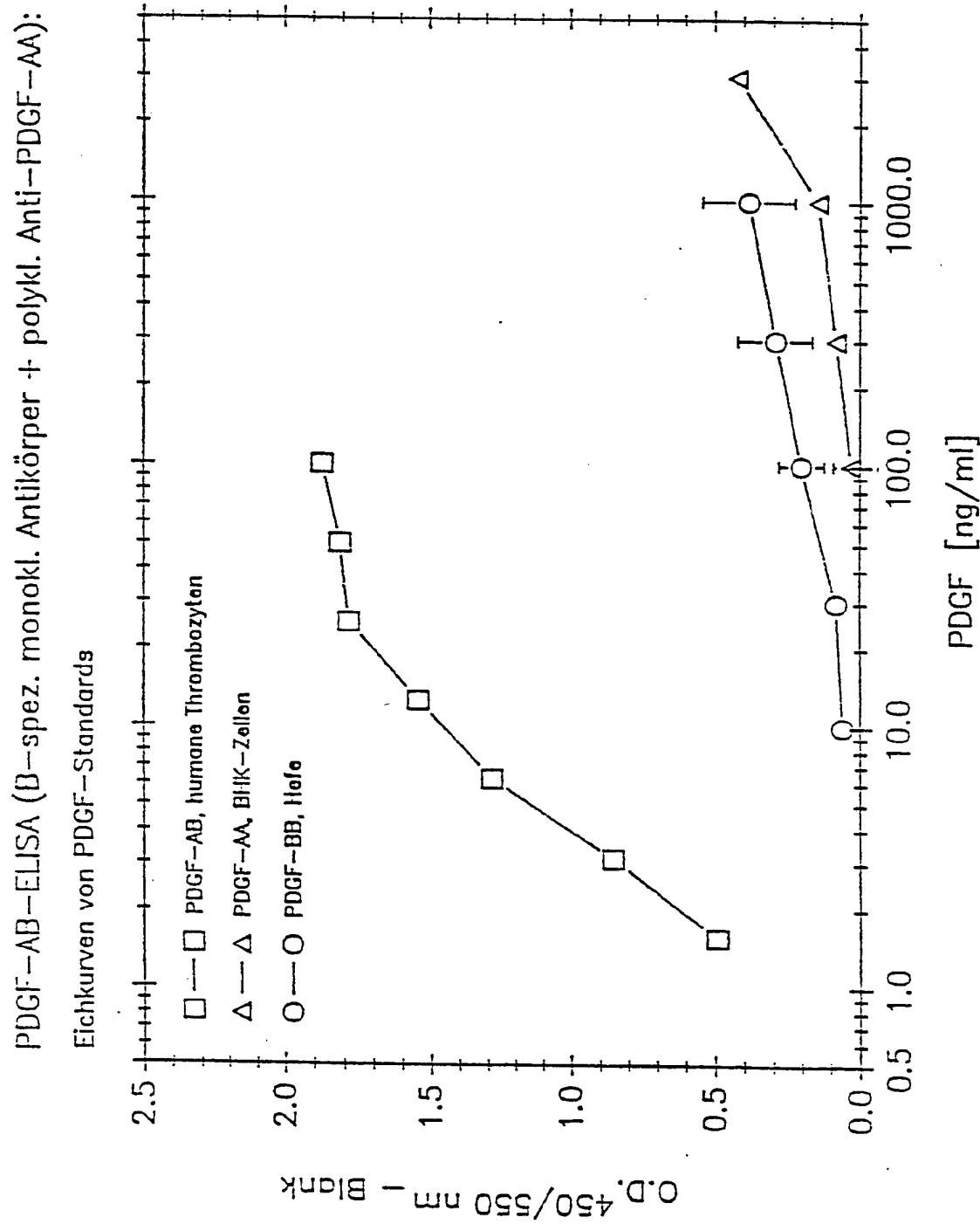
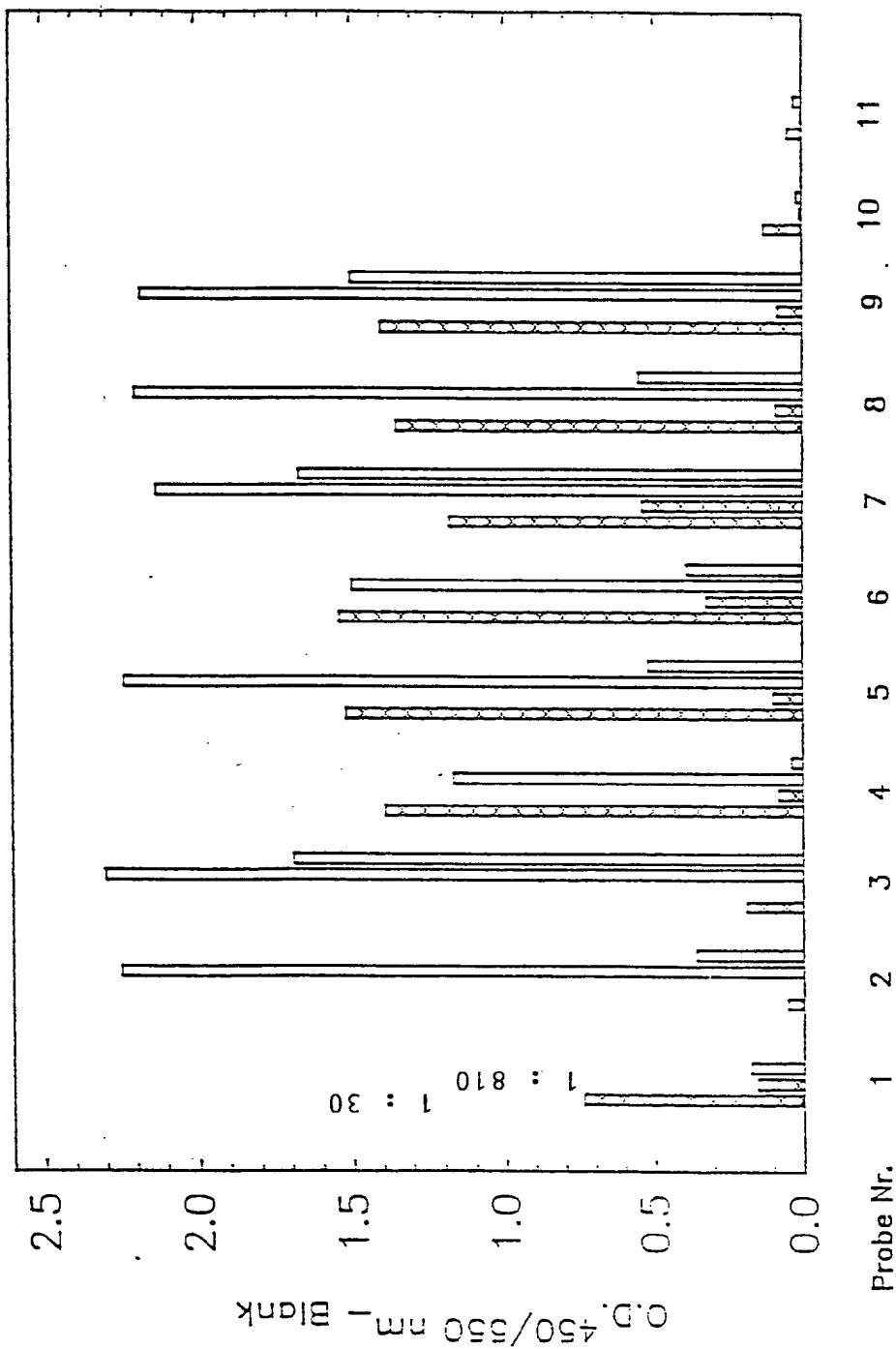


Figure 9

23/23

Kulturerstünde von rekomb. BHK-Zellen (1 : 30 bzw 1:810 verd.) im ELISA I  
mittels polykl. Antikörper: Anti-PDGF- $\alpha\alpha$  und Anti-PDGF- $\beta\beta$



ERSATZBLATT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/EP 93/02294

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 C12N15/12 C12N15/63 C12N15/67 C12N15/85 C07K13/00  
A61K37/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 5 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 259 632 (ZYMOGENETICS, INC.) 16 March 1988 cited in the application see page 12, line 29 - line 35; claims 1-36; figures 1-8 ---	26-30
X	J. BIOL. CHEM. vol. 263, no. 31 , 5 November 1988 , AM. SOC. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US; pages 16202 - 16208 A. OSTMAN ET AL. 'Synthesis and assembly of a functionally active recombinant platelet-derived growth factor AB heterodimer' cited in the application see page 16205, right column, line 12 - page 16207, right column, line 17; figure 1 --- -/-	26-28

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 November 1993

Date of mailing of the international search report

2-01-1994

## Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

## Authorized officer

Hornig, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/EP 93/02294

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOCHEMISTRY vol. 29, no. 1 , 9 January 1990 , AM. CHEM. SOC., WASHINGTON, DC, US; pages 166 - 172 C.E. HART ET AL. 'Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets' cited in the application see page 168, right column, line 20 - page 169, left column, line 22 see page 169, left column, line 23 - right column, line 8; figure 1 ---	26-28
Y	WO,A,90 01550 (ZYMOGENETICS, INC.) 22 February 1990 cited in the application see page 7, line 15 - page 8, line 10; claims 1-15 ---	1-6
Y	MOL. CELL. BIOL. vol. 11, no. 5 , May 1991 , AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, D.C. US; pages 2656 - 2664 D. FALCONE AND D.W. ANDREWS 'Both the 5' untranslated region and the sequences surrounding the start site contribute to efficient initiation of translation in vitro' cited in the application see page 2662, left column, paragraph 2 - page 2663, left column, paragraph 3; figure 2 ---	1-6
A	WO,A,90 08163 (HOPPE, J.) 26 July 1990 cited in the application see page 13, line 1 - page 14, line 11; claims 1-14 ---	26-30
A	J. BIOL. CHEM. vol. 263, no. 31 , 5 November 1988 , AM. SOC. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US; pages 16493 - 16498 A. HAMMACHER ET AL. 'A major part of platelet-derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain' cited in the application insgesamt ---	26-30
2	-/-	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/EP 93/02294

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCE      vol. 15, no. 12 , December 1990 , ELSEVIER      SCIENCE, AMSTERDAM, NL;      pages 477 - 483      R.J. JACKSON ET AL. 'The novel mechanism      of initiation of picornavirus RNA      translation'      cited in the application      insgesamt      ---</p>	1-3
A	<p>NUCL. ACID RES.      vol. 19, no. 16 , 25 August 1991 , IRL      PRESS, OXFORD, ENGLAND;      pages 4485 - 4490      R.J. KAUFMAN ET AL. 'Improved vectors for      stable expression of foreign genes in      mammalian cells by use of the untranslated      leader sequence from EMC virus'      cited in the application      insgesamt      ---</p>	1-3
P,Y	<p>WO,A,93 03143 (ANDERSON, W., MORGAN, R.A.,      COUTURE, L.) 18 February 1993      see page 5, line 16 - page 9, line 17      -----</p>	1-6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 93/02294

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0259632	16-03-88	US-A-	4766073	23-08-88
		US-A-	4849407	18-07-89
		US-A-	4845075	04-07-89
		US-A-	4889919	26-12-89
		AU-A-	7681687	18-02-88
		AU-B-	641816	30-09-93
		AU-B-	8695791	19-03-91
		JP-A-	63119682	24-05-88
		US-A-	5128321	07-07-92
		US-A-	5187263	16-02-93
-----				
WO-A-9001550	22-02-90	AU-A-	4036389	05-03-90
		EP-A-	0426744	15-05-91
		JP-T-	4500004	09-01-92
-----				
WO-A-9008163	26-07-90	DE-A-	3900770	26-07-90
		AU-A-	4836790	13-08-90
		EP-A-	0453456	30-10-91
		JP-T-	4504407	06-08-92
-----				
WO-A-9303143	18-02-93	NONE		
-----				

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/02294

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 5 C12N15/12 C12N15/63 C12N15/67 C12N15/85 C07K13/00  
 A61K37/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK.

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole )  
 IPK 5 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 259 632 (ZYMOGENETICS, INC.) 16. März 1988 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 12, Zeile 29 - Zeile 35; Ansprüche 1-36; Abbildungen 1-8 ----	26-30
X	J. BIOL. CHEM. Bd. 263, Nr. 31 , 5. November 1988 , AM. SOC. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US; Seiten 16202 - 16208 A. OSTMAN ET AL. 'Synthesis and assembly of a functionally active recombinant platelet-derived growth factor AB heterodimer' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 16205, rechte Spalte, Zeile 12 - Seite 16207, rechte Spalte, Zeile 17; Abbildung 1 ---- -/-	26-28

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'\*&amp;' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

2

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
25. November 1993	06 -01- 1994
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Hornig, H

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/02294

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BIOCHEMISTRY Bd. 29, Nr. 1 , 9. Januar 1990 , AM. CHEM. SOC., WASHINGTON, DC, US; Seiten 166 - 172 C.E. HART ET AL. 'Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 168, rechte Spalte, Zeile 20 - Seite 169, linke Spalte, Zeile 22 siehe Seite 169, linke Spalte, Zeile 23 - rechte Spalte, Zeile 8; Abbildung 1 ---	26-28
Y	WO,A,90 01550 (ZYMOGENETICS, INC.) 22. Februar 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 7, Zeile 15 - Seite 8, Zeile 10; Ansprüche 1-15 ---	1-6
Y	MOL. CELL. BIOL. Bd. 11, Nr. 5 , Mai 1991 , AM. SOC. MICROBIOL., WASHINGTON, D.C. US; Seiten 2656 - 2664 D. FALCONE AND D.W. ANDREWS 'Both the 5' untranslated region and the sequences surrounding the start site contribute to efficient initiation of translation in vitro' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 2662, linke Spalte, Absatz 2 - Seite 2663, linke Spalte, Absatz 3; Abbildung 2 ---	1-6
A	WO,A,90 08163 (HOPPE, J.) 26. Juli 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 13, Zeile 1 - Seite 14, Zeile 11; Ansprüche 1-14 ---	26-30
A	J. BIOL. CHEM. Bd. 263, Nr. 31 , 5. November 1988 , AM. SOC. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US; Seiten 16493 - 16498 A. HAMMACHER ET AL. 'A major part of platelet-derived growth factor purified from human platelets is a heterodimer of one A and one B chain' in der Anmeldung erwähnt insgesamt ----	26-30
	-/--	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/02294

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCE Bd. 15, Nr. 12 , Dezember 1990 , ELSEVIER SCIENCE, AMSTERDAM, NL; Seiten 477 - 483 R.J. JACKSON ET AL. 'The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation' in der Anmeldung erwähnt insgesamt ---	1-3
A	NUCL. ACID RES. Bd. 19, Nr. 16 , 25. August 1991 , IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; Seiten 4485 - 4490 R.J. KAUFMAN ET AL. 'Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus' in der Anmeldung erwähnt insgesamt ---	1-3
P,Y	WO,A,93 03143 (ANDERSON, W., MORGAN, R.A., COUTURE, L.) 18. Februar 1993 siehe Seite 5, Zeile 16 - Seite 9, Zeile 17 -----	1-6

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inter. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/02294

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A-0259632	16-03-88	US-A-	4766073	23-08-88
		US-A-	4849407	18-07-89
		US-A-	4845075	04-07-89
		US-A-	4889919	26-12-89
		AU-A-	7681687	18-02-88
		AU-B-	641816	30-09-93
		AU-B-	8695791	19-03-91
		JP-A-	63119682	24-05-88
		US-A-	5128321	07-07-92
		US-A-	5187263	16-02-93
-----				
WO-A-9001550	22-02-90	AU-A-	4036389	05-03-90
		EP-A-	0426744	15-05-91
		JP-T-	4500004	09-01-92
-----				
WO-A-9008163	26-07-90	DE-A-	3900770	26-07-90
		AU-A-	4836790	13-08-90
		EP-A-	0453456	30-10-91
		JP-T-	4504407	06-08-92
-----				
WO-A-9303143	18-02-93	KEINE		
-----				